

# MEDICINA · BALEAR

PUBLICACIÓ DE LA REIAL ACADÈMIA DE MEDICINA DE LES ILLES BALEARS

Análisis del ratio arteria pulmonar - aorta como factor pronóstico de mortalidad en población infectada por el VIH

Búsqueda de nuevas dianas terapéuticas de cáncer de pulmón

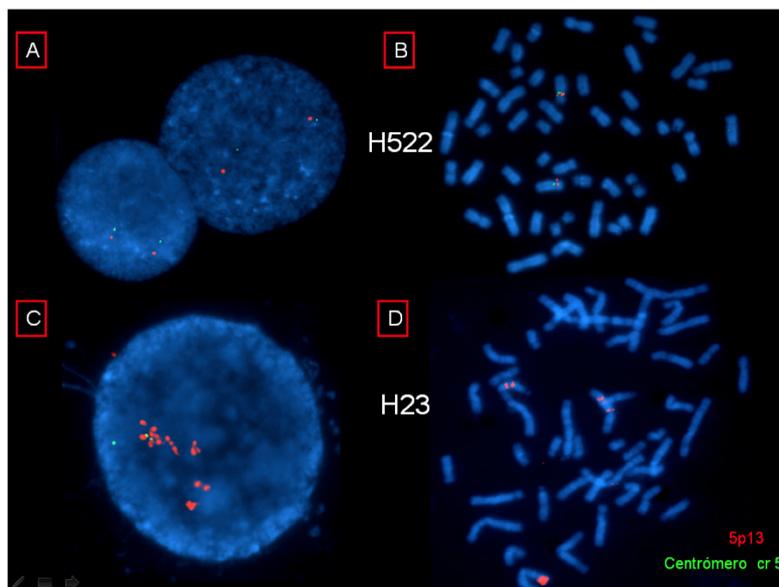
Evaluación de la relación entre factores de riesgo cardiovascular, las lesiones endoscópicas de la papila renal y el tipo de litiasis renal

Análisis de la dinámica poblacional de las infecciones respiratorias agudas pediátricas causadas por virus (2015-2016)

Calidad en citología de cérvix: importancia de la toma

Incidentaloma en atención primaria

Carcinoma células pequeñas vesical y colitis fulminante



**Medicina Balear**, òrgan de la Reial Acadèmia de Medicina de les Illes Balears, va aparèixer el 1986 amb l'objectiu de donar curs a les inquietuds científiques i fomentar l'esperit d'investigació dels professionals de la sanitat balear i amb la pretensió suplementària de projectar en la societat temes d'interès sanitari.

**Medicina Balear** publica en català, castellà o anglès treballs originals, articles de revisió, cartes al director i altres escrits d'interès relacionats amb les ciències de la salut i presta particular atenció als treballs que tinguin per àmbit les Illes Balears i altres territoris de la conca mediterrània occidental. La revista sotmet els originals a la revisió anònima per al menys dos experts externs (peer review).



El material científic publicat a **Medicina Balear** resta protegit per drets d'autor. **Medicina Balear** no és responsable de la informació i opinions dels autors.

Aquesta obra -llevat que s'indiqui el contrari en el text, en les fotografies o en altres il·lustracions- és subjecta a la llicència de Reconeixement-NoComercial-SenseObraDerivada 3.0 Espanya de Creative Commons; <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es/>. Així, doncs, s'autoritza al públic en general a reproduir, distribuir i comunicar l'obra sempre que se'n reconegui l'autoria i l'entitat que la publica i no se'n faci un ús comercial ni cap obra derivada.

**Medicina Balear** es troba incorporada a la Biblioteca Digital de les Illes Balears, de la Universitat de les Illes Balears, i està inclosa en les bases de dades següents: Latindex (catàleg), Dialnet, Índice Médico Español, DOAJ, Imbiomed



Índice  
Médico  
Español

Dialnet

latindex

DOAJ  
DIRECTORY OF  
OPEN ACCESS  
JOURNALS



## EDITA

Reial Acadèmia de Medicina de les Illes Balears



[www.ramib.org](http://www.ramib.org)

Campaner, 4, baixos. 07003 Palma de Mallorca Tel. 971 72 12 30 Email: [info@ramib.org](mailto:info@ramib.org)  
Pàgina web: <http://www.ramib.org>

Dipòsit Legal: PM 486 - 95

eISSN: 2255 - 0569

## Disseny i maquetació

Intelagencia Publicitat - [www.intelagencia.es](http://www.intelagencia.es) - [intelagencia@intelagencia.es](mailto:intelagencia@intelagencia.es)

# MEDICINA · BALEAR

Publicació quadrimestral de ciències de la salut de la Reial Acadèmia de Medicina de les Illes Balears

**Director** A. Arturo López González, *RAMIB*,  
Reial Acadèmia de Medicina de les Illes Balears (*RAMIB*)

## CONSELL EDITORIAL

**Subdirector** Joan March Noguera, *RAMIB*  
**Editor científic** Marta Couce Matovelle, *Case Western Reserve University*  
**Assessors editorials** José A. Guijarro Pastor, *AEMET* · Jaume Rosselló Mir, *UIB*  
**Redactor en cap** J. L. Olea Vallejo, *RAMIB*  
**Vocals** Antoni Aguiló Pons, *Universitat de les Illes Balears* · Antonia Barceló Bennassar, *Hospital Son Espases* · Bartolomé Burguera González, *Cleveland Clinic (Ohio)* · Amador Calafat Far, *Socidrogalcohol* · Carlos Campillo Artero, *Universitat Pompeu Fabra* · Valentín Esteban Buedo, *Conselleria de Sanitat, Generalitat Valenciana* · Carmen González Bosch, *Universitat de València* · Miguel A. Limon Pons, *Institut Menorquí d'Estudis* · Jordi Martínez Serra, *Hospital Son Espases* · Virgili Páez Cervi, *Bibliosalut* · Lucio Pallarés Ferreres, *Hospital Son Espase* · Ignacio Ricci Cabello, *University of Oxford* · Guillermo Sáez Tormo, *Universitat de València* · M<sup>a</sup> Teófila Vicente Herrero, *IUNICS*

## CONSELL CIÈNTIFIC

M<sup>a</sup> José Anadón Baselga (*Universidad Complutense de Madrid*), Miquel Capó Martí (*Universidad Complutense de Madrid*), Antonio Coca Payeras (*Universitat de Barcelona*), James Drane (*Edinboro University*), Leopoldo Forner Navarro (*Universitat de València*), Alexandre García-Mas, (*Universitat de les Illes Balears*), Antoni Gelabert Mas (*Universitat Autònoma de Barcelona*), Joan Grimalt Obrador (*Consell Superior d'Investigacions Científiques, CSIC*), Federico Hawkins Carranza (*Universidad Complutense de Madrid*), Joan Carles March Cerdà (*Escuela Andaluza de Salud Pública, EASP*), Gabriel Martí Amengual (*Universitat de Barcelona*), Jasone Monasterio Aspiri (*Universitat Autònoma de Barcelona*) Rosa Pulgar Encinas (*Universidad de Granada*), Ciril Rozman (*Universitat de Barcelona*).

## Amb la col·laboració de



G O I B  
CONSELLERIA  
PRESIDÈNCIA

Fundació  
Patronat Científic



Col·legi de Metges  
Illes Balears

[www.medicinabaleaar.org](http://www.medicinabaleaar.org)



## PREMIOS Y BECAS

### PREMIOS DE INVESTIGACIÓN 2018

La **Fundació Patronat Científic** convoca los Premios de Investigación **Mateu Orfila, Damià Carbó y Metge Matas** con la finalidad de **premiar la trayectoria de la investigación en Ciencias de la Salud** en nuestra comunidad.

<http://www.comib.com/wp-content/uploads/2018/01/Premios-investigacion-2018-W.pdf>

### PREMIO FUNDACIÓ MUTUAL MÈDICA AL MEJOR PROYECTO DE TESIS DOCTORAL

El premio tiene como finalidad **facilitar a los médicos colegiados** en las Illes Balears la **obtención del título de Doctor**. Con el patrocinio de la **Fundació Mutual Mèdica**.

<http://www.comib.com/wp-content/uploads/2018/01/Poster-Becas-Mutual-2018-W.pdf>

### BECAS FUNDACIÓ BANCO SABADELL DE ROTACIÓ EXTERNA PARA MÉDICOS RESIDENTES

Facilitar a los médicos que realicen la residencia en hospitales de Balears la **formación**, al menos durante un mes, en **centros hospitalarios nacionales y extranjeros**, en el último año de la residencia o al terminar la misma.

<http://www.comib.com/wp-content/uploads/2018/01/Poster-Becas-Sabadell-2018-W.pdf>

### BECAS DE INNOVACIÓN PARA MÉDICOS COLEGIADOS, EXCEPTO MIR

Tienen como objetivo facilitar a los médicos colegiados en las Illes Balears, excepto MIR, la **formación**, durante al menos un mes, en **centros sanitarios nacionales y extranjeros en técnicas diagnósticas o terapéuticas**.

<http://www.comib.com/wp-content/uploads/2018/01/Poster-Beca-Innovacion-2018-W.pdf>

### CERTAMEN DE CASOS CLÍNICOS PARA MÉDICOS RESIDENTES 2018

La Fundació Patronat Científic convoca el Certamen de Casos Clínicos 2018 de cualquier **especialidad médica o quirúrgica para médicos residentes**.

<http://www.comib.com/wp-content/uploads/2018/01/II-Certamen-de-casos-clinicos-residentes-W.pdf>

### PREMIO CAMILO JOSÉ CELA DE HUMANIDADES MÉDICAS

Premio literario destinado a **honrar la especial relación que tuvo el Nobel con los médicos** a lo largo de su vida.

<http://www.comib.com/wp-content/uploads/2018/01/Premio-Camilo-Jose-Cela-2018-W.pdf>

# MEDICINA • BALEAR

PUBLICACIÓ DE LA REIAL ACADÈMIA DE MEDICINA DE LES ILLES BALEARS

[www.medicinabaleaer.org](http://www.medicinabaleaer.org)

## SUMARI

### EDITORIAL

**¿Por qué existen las ONG sanitarias?** ..... 9

Miguel Reyero

### ORIGINALS

**Análisis del ratio arteria pulmonar - aorta como factor pronóstico de mortalidad en población infectada por el VIH** ..... 11-18

Francisco Fanjul, Gloria Sampérez, Melchor Riera

**Búsqueda de nuevas dianas terapéuticas de cáncer de pulmón** ..... 19-33

Pedro P. Medina Vico

**Evaluación de la relación entre factores de riesgo cardiovascular, las lesiones endoscópicas de la papila renal y el tipo de litiasis renal** ..... 34-41

Xavier Arnau Sabaté Arroyo, Enrique Carmelo Pieras Ayala, Valentí Tubau Vidaña, Jorge Guimerá García, José Luis Bauzá Quetglas, Pedro Pizá Reus

**Análisis de la dinámica poblacional de las infecciones respiratorias agudas pediátricas causadas por virus (2015-2016)** ..... 42-47

Jordi Reina, Ester del Barrio, Carmen Morales, María Busquets, Cristina Norte

### ORIGINAL BREU

**Calidad en citología de cérvix: importancia de la toma** ..... 48-49

Forteza A, Oliveras M, Javier Cortés

### ESTUDI DE CASOS

**Incidentaloma en atención primaria** ..... 50-53

Yolanda Gómez López, Mónica Sorribas Morlán, Rafael Hernandez Silva, María Antonia Nigorra Vich, Cristina Guerra Feo, Salvador Gastoso Gayà

**Carcinoma células pequeñas vesical y colitis fulminante** ..... 54-57

Beatriz Crespo Martín, Héctor Rodrigo Lara, Evelin Horvath, Isabel Amengual Antich, Manuel del Rio Vizoso, Elisa Torres del Pliego



# ¿Qué profesional puede tener 45 años de edad y 90 de experiencia?

La respuesta es Banca March

La experiencia de un profesional no está únicamente en su edad, sino también en la edad de la firma para la que trabaja.

Y 90 años de experiencia es lo que ofrecen los profesionales de Banca March.

90 años gestionando patrimonios y demostrando entre otras cosas, que la prudencia no está reñida con la rentabilidad.

 **BancaMarch**

# MEDICINA • BALEAR

SCIENTIFIC JOURNAL OF THE ROYAL ACADEMY OF MEDICINE OF THE BALEARIC ISLANDS

www.medicinabaleaer.org

## CONTENTS

### EDITORIAL

- Why are there health NGOs?** \_\_\_\_\_ 9  
Miguel Reyero

### ORIGINALS

- Analysis of the pulmonary artery to aorta ratio as a prognostic factor of mortality in an HIV - infected population** \_\_\_\_\_ 11-18  
Francisco Fanjul, Gloria Sampérez, Melchor Riera

- Search for new therapeutic targets for lung cancer** \_\_\_\_\_ 19-33  
Pedro P. Medina Vico

- Evaluation of the relationship between cardiovascular risk factors, endoscopic lesions of the renal papilla and the type of renal lithiasis** \_\_\_\_\_ 34-41  
Xavier Arnau Sabaté Arroyo, Enrique Carmelo Pieras Ayala, Valentí Tubau Vidaña, Jorge Guimerá García, José Luis Bauzá Quetglas, Pedro Pizá Reus

- Analysis of the population dynamics of pediatric acute respiratory infections caused by viruses (2015-2016)** \_\_\_\_\_ 42-47  
Jordi Reina, Ester del Barrio, Carmen Morales, María Busquets, Cristina Norte

### ORIGINAL BREU

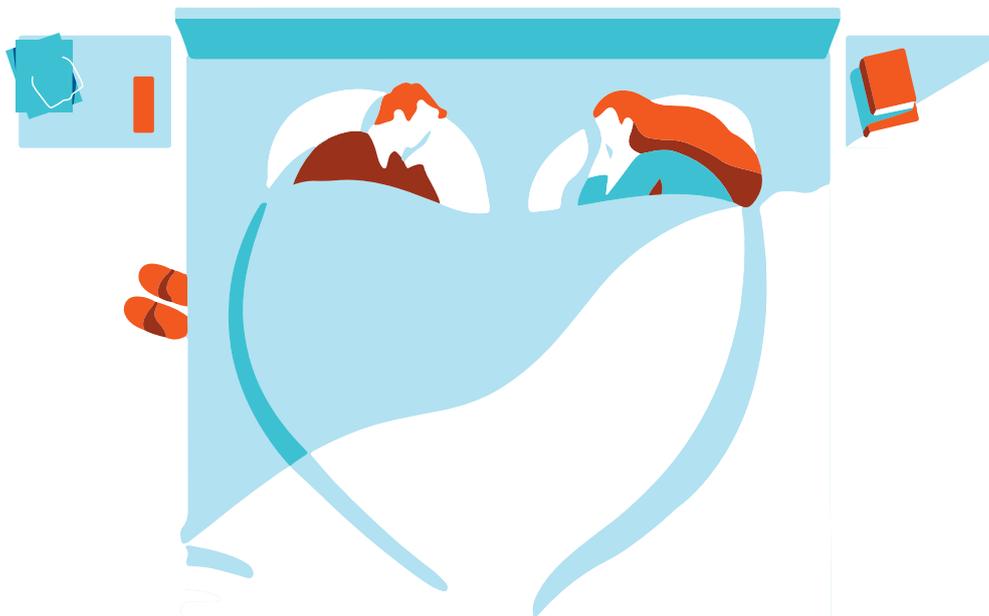
- Quality in cervical cytology: the importance of how to take it** \_\_\_\_\_ 48-49  
Forteza A, Oliveras M, Javier Cortés

### ESTUDI DE CASOS

- Incidentaloma in primary health care** \_\_\_\_\_ 50-53  
Yolanda Gómez López, Mónica Sorribas Morlán, Rafael Hernandez Silva, María Antonia Nigorra Vich, Cristina Guerra Feo, Salvador Gastoso Gayà

- Small-cell bladder carcinoma and fulminant colitis** \_\_\_\_\_ 54-57  
Beatriz Crespo Martín, Héctor Rodrigo Lara, Evelin Horvath, Isabel Amengual Antich, Manuel del Rio Vizoso, Elisa Torres del Pliego

Haz algo grande por tu salud



# #Duerme 1HoraMás

En Asisa somos expertos en salud y sabemos que el sueño es vital para el buen funcionamiento de tu corazón, tu cerebro y todo tu organismo.

Los especialistas determinan que **una persona adulta necesita entre 7 y 9 horas diarias de sueño** para estar bien.

Sin embargo, se estima que el 80% de los españoles duermen menos de este tiempo,

exponiéndose a **sufrir hipertensión, taquicardia, depresión, pérdida de memoria, sobrepeso y diabetes**, entre otros problemas. Y como sabes, **en Asisa solo nos preocupa tu salud. Por eso invertimos todos nuestros recursos en cuidarte**, incluido este anuncio en el que te aconsejamos que duermas una hora más todos los días.

Empresa Colaboradora:

**200**  
**AÑOS**

Asisa Palma de Mallorca.  
C/ Pere Dezcallar i Net, 10  
**asisa.es 901 10 10 10**

*Nada más que tu salud  
Nada menos que tu salud*

**asisa** 

## EDITORIAL

# ¿Por qué existen las ONG sanitarias?

*Why are there health NGOs?*

**Miguel Reyero**

*Médicos del Mundo*

Eso nos preguntamos la mayoría de las mujeres y hombres que trabajamos en estas organizaciones buscando garantizar el derecho a la salud de millones de personas que se ven privadas de él en todo el mundo. No debíamos tener que existir, porque son los Estados quienes tienen la obligación de garantizarlo. Y junto con los Estados que un día suscribieron la Declaración Universal de los Derechos humanos, otros organismos supranacionales con la Organización Mundial de la Salud a la cabeza.

Pero quienes tienen esas obligaciones están muy lejos de cumplirlas. La pobreza, y todavía más la desigualdad en el reparto de la riqueza, condicionan la salud y la vida de la inmensa mayoría de la humanidad. Con frecuencia, esa situación la imaginamos en los países empobrecidos, donde la posibilidad de que una mujer muera en el parto es de 1 por cada 8 nacimientos –en Afganistán o Níger– frente a una de cada 30.000 partos en España o Suecia, por utilizar un indicador que refleja a la vez la (in)justicia social, la desigualdad de género y la pobreza.

El recién nacido de una mujer analfabeta en Bolivia tiene un 10 % de posibilidades de morir en la infancia, frente al 0,4% si su madre tiene estudios secundarios. Elementos básicos que determinan la distancia entre la vida y la muerte, como son la disponibilidad de agua potable, saneamiento y electricidad no están al alcance de miles de millones de personas. Y siempre, en todas esas situaciones de riesgo de enfermedad y de muerte, sobrevivir es más difícil para las mujeres que para los hombres. Más de la mitad de la humanidad no dispone de acceso a los medicamentos básicos, y casi dos tercios no cuenta con un sistema público de salud accesible. Disponer de ese sistema de cobertura universal, financiado con dinero público proveniente de impuestos, no garantiza por sí solo la salud de la población, pero sí es un elemento determinante para la misma, según recuerda la Organización Mundial de la Salud (OMS).

También en el mundo enriquecido las diferencias de salud en función del nivel de renta son enormes, aunque no siempre las visualicemos. En Glasgow, un varón de un barrio pobre tiene al nacer una esperanza de vida 28 años menor que la de otro escocés acomodado. En Barcelona o Madrid se han hecho análisis con resultados similares, que prueban la aseveración de que “el código postal es más determinante para la salud que el código genético”. En Mallorca no existen amplios estudios de esa misma índole, pero hay datos parciales de la situación de salud de poblaciones de barriadas desfavorecidas como Son Gotleu o Son Banya respecto a zonas de alto nivel de vida. También en nuestro entorno conviven -ante nuestros ojos y los de nuestras autoridades- esas graves diferencias.

## El papel de las ONG

La situación descrita justifica la existencia de las ONG. Como organizaciones de la sociedad civil en modo alguno pueden –ni desean hacerlo, porque no es su misión– asumir la asistencia sanitaria de las poblaciones. Pueden, puntual y transitoriamente, sustituir a las administraciones en situaciones límites, y en fragmentos de población concretos: víctimas de catástrofes o de guerras, minorías excluidas y olvidadas como mujeres prostituidas o usuarios de drogas; o población inmigrante que tiene barreras para acceder a los cuidados de salud. Pero mucho más que esa atención sanitaria necesariamente limitada a la atención básica y a un pequeño número de personas, la misión de las ONG del ámbito sanitario es señalar la injusta falta de respuesta de quienes tienen la obligación de garantizar la salud de las personas. Colocar a las personas que tienen derechos frente a quienes tienen la obligación de garantizarlos. Esa es nuestra justificación temporal, y nuestra aspiración es que quien tiene la responsabilidad de garantizar la salud de (toda) la ciudadanía la asuma lo antes posible, para que las ONG dejemos de ser necesarias.

Obviamente nuestras organizaciones tienen limitaciones y problemas. Ocasionalmente aparece una noticia informada de que una persona relacionada con una ONG ha cometido un determinado delito precisamente con una persona de la población a la que está atendiendo. El que sean un limitadísimo número de casos frente a los miles y miles de hombres y mujeres que como profesionales técnicos o como voluntariado dedican sus esfuerzos en todo el mundo para mejorar la salud de las personas en absoluto debe tranquilizarnos.

Aunque el compromiso con la población y con los principios éticos de las organizaciones se acompaña de modo cada vez de modo más estricto con medidas de seguridad para detectar esos pocos casos (uno solo sería demasiado), aislarlo y denunciarlo es para nosotros un objetivo prioritario. Afortunadamente, la sociedad entiende bien quiénes somos y qué hacemos, por lo que reiteradamente en las encuestas de opinión se sitúa a las organizaciones humanitarias como uno de los elementos mejor valorados de la sociedad. Quizá porque esa sociedad y las personas que la integramos sabemos bien que, en palabras de la presidenta de la OMS, “la inequidad sanitaria es verdaderamente una cuestión de vida o muerte, pero los sistemas de salud no tenderán espontáneamente hacia ella. Reducir esas desigualdades que matan en los países empobrecidos y en nuestro entorno inmediato es un imperativo ético y una obligación de los Estados”.

Conseguir que algún día esa obligación llegue a asumirse y que la salud sea realmente un derecho universal es, pues, el objetivo que, aun conociendo nuestras limitaciones, nos marcamos.



DESCUBRA NUESTRAS  
**COBERTURAS  
EXCLUSIVAS**  
PENSADAS  
PARA USTED  
Y SU HOGAR

Hasta un

**25%<sup>\*</sup>**  
dto.

**en su Seguro de Hogar**

LA LLAVE DE LA SEGURIDAD DE SU CASA

- ✓ MANITAS DEL HOGAR
- ✓ MANITAS DE ASISTENCIA
- ✓ MANITAS TECNOLÓGICO
- ✓ ASISTENCIA INFORMÁTICA



**www.amaseguros.com**  
**902 30 30 10**

**A.M.A. PALMA DE MALLORCA**

Barón de Pinopar, 10 Tel. 971 71 49 82 [pmallorca@amaseguros.com](mailto:pmallorca@amaseguros.com)

Síganos en     

(\* Promoción válida para presupuestos de nueva contratación, realizados hasta el 30 de junio de 2017. No acumulable a otras ofertas. Consulte condiciones en su oficina provincial A.M.A.

## ORIGINAL

# Análisis del ratio arteria pulmonar - aorta como factor pronóstico de mortalidad en población infectada por el VIH

*Analysis of the pulmonary artery to aorta ratio  
as a prognostic factor of mortality in an HIV - infected population*

**Francisco Fanjul<sup>1</sup>, Gloria Sampériz<sup>2</sup>, Melchor Riera<sup>1</sup>**

1. Unidad de enfermedades infecciosas. Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario Son Espases. Palma

2. Unidad de Enfermedades Infecciosas. Hospital Miguel Servet. Zaragoza

**Correspondencia**

Francisco Fanjul  
Unidad de enfermedades infecciosas  
Servicio de Medicina Interna  
Hospital Universitario Son Espases  
Carretera de Valldemossa, 79. 07010 - Palma  
E-mail: ffanjul@gmail.com

**Recibido:** 8 - I - 2018

**Aceptado:** 23 - III - 2018

**doi:** 10.3306/MEDICINABALEAR.33.02.11

**Resumen**

**Antecedentes:** La prevalencia de enfermedad pulmonar crónica obstructiva (EPOC) e hipertensión pulmonar (HTP) en pacientes infectados por el VIH es elevada. En pacientes con EPOC el ratio arteria pulmonar-aorta (AP:A)  $\geq 1$  podría ser un marcador diagnóstico de HTP y pronóstico de mortalidad e ingresos, sin embargo este ratio no ha sido estudiado en población infectada por el VIH.

**Objetivos:** Valorar el ratio AP:A como predictor de mortalidad o ingreso en una cohorte de pacientes infectados por el VIH.

**Materiales y métodos:** Estudio de cohorte prospectiva incluyendo una muestra aleatorizada de pacientes infectados por el VIH con edad 40-69 años, estables clínicamente y sin antecedentes de cardiopatía, nefropatía o hepatopatía avanzada. Se realiza TC torácico de alta resolución con cálculo de ratio AP:A, estimación del enfisema cuantitativo, pruebas funcionales respiratorias. Se realiza análisis estadístico de la relación entre AP:A y mortalidad mediante curva COR y análisis de supervivencia multivariante de Cox.

**Resultados:** Se incluyen 187 pacientes, con seguimiento medio de 7.65 años, mortalidad observada de 18.8/1000 pacientes-año. El 22.36% de los pacientes presentaban EPOC. El ratio AP:A medio fue  $0.83 \pm 0.11$ , el 4,3% de pacientes presentó ratio  $\geq 1$  y no se apreciaron diferencias en función de mortalidad ni en la muestra global ni en subgrupo de pacientes con EPOC. En el análisis de supervivencia solo la DLCO y la presencia de diabetes resultaron significativas.

**Conclusiones:** El ratio AP:A no resulta un marcador pronóstico de mortalidad o ingreso hospitalario.

**Palabras clave:** VIH, EPOC, hipertensión pulmonar, ratio arteria pulmonar aorta.

**Abstract**

**Background:** Prevalence of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and pulmonary hypertension (PH) is high in HIV-infected patients. Pulmonary artery to aorta (PA:A) ratio  $\geq 1$  has been proposed as diagnostic of PH and predictive of mortality and hospitalary admissions in COPD patients. Up to date this ratio has not been validated in HIV-infected populations.

**Objective:** To assess PA:A ratio predictive role of mortality and admissions in a HIV-infected sample.

**Methods:** Prospective cohort study including a randomly selected sample of adult HIV- infected patients aged 40-69 and clinical stable excluding those with heart, liver or renal advanced disease. Patients underwent high resolution CT chest scan with quantitative emphysema measure and PA:A estimation and lung function tests. Statistical analysis included ROC curve and Cox multivariate survival regression to analyze PA:A ratio predictive capacity.

**Results:** We included 187 patients, 7.65 years mean followup and mortality rate of 18.8/1000 patients-year. 22.36% of the patients had COPD. Mean PA:A ratio was  $0.83 \pm 0.11$ , 4.3% had  $\geq 1$  ratio. No ratio differences were observed in patients according to mortality or COPD. In multivariate survival analysis only DLCO and diabetes were associated with mortality.

**Conclusions:** PA:A ratio is not predictive of mortality or hospital admissions in a sample of HIV infected patients.

**Keywords:** HIV, COPD, Pulmonary Hypertension, Pulmonary artery to aorta ratio.

## Introducción

En los últimos 15 años la progresiva mejoría de los tratamientos antirretrovirales y el mayor conocimiento de la infección por el VIH del que disponemos han tenido como consecuencia un envejecimiento progresivo de la población infectada convirtiendo lo que era una infección letal a corto-medio plazo por la aparición de infecciones oportunistas en una patología crónica.

Además de este envejecimiento, el mejor control inmunoviroológico ha provocado que, a diferencia de épocas anteriores a la llegada de los tratamientos de gran actividad, las causas actuales de muerte predominantes en los pacientes infectados por el VIH se acercan cada vez más a las esperables en población general.

En la actualidad, los eventos cardiovasculares incidentes, la patología pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y las neoplasias están entre las primeras causas de mortalidad de pacientes infectados por el VIH en los países desarrollados.<sup>1</sup>

### Prevalencia de EPOC

La prevalencia de limitación al flujo aéreo reportada en estudios realizados en los últimos 10 años en poblaciones infectadas por el VIH es superior a la observada en población general. Estas diferencias de prevalencia han sido publicadas de manera consistente en estudios realizados tanto de poblaciones estadounidenses como europeas e incluso cohortes locales en las que hemos observado prevalencias de EPOC de hasta un 25%.<sup>2,3</sup> Es por ello que en las últimas guías GOLD se considera por primera vez la infección por el VIH como un factor de riesgo en el desarrollo de EPOC.<sup>4</sup>

Es probable que la causa de esta diferencia no sea única y requiera un enfoque multifactorial. En primer lugar, la población infectada por el VIH tiene tradicionalmente una mayor prevalencia de tabaquismo y consumo de otros tóxicos lo que podría explicar al menos en parte las diferencias observadas entre poblaciones pero que no explica por qué incluso tras análisis multivariantes ajustados por tabaquismo y otros tóxicos la prevalencia continúa siendo superior en pacientes VIH.<sup>5</sup>

En segundo lugar, la inmunosupresión de los pacientes infectados por el VIH podría asociar una incidencia superior de infecciones en el tracto respiratorio que a su vez podrían suponer un daño a nivel del parénquima pulmonar y el tejido bronquial.

Sin embargo, la causa principal que probablemente explique en mejor medida las diferencias observadas, sea el estado proinflamatorio causado por la propia infección por el VIH. La inflamación continua desencadenada por la replicación viral (incluso de bajo grado en pacientes con cargas virales plasmáticas indetectables) provoca

una cascada inflamatoria con niveles elevados de citoquinas e interleuquinas y un viraje de la activación de los macrófagos con un aumento del daño tisular, siendo este un factor determinante en la aparición de áreas de enfisema.<sup>6</sup>

Esta hipótesis del estado proinflamatorio como causa principal de EPOC en pacientes VIH ayudaría también a explicar el por qué los pacientes infectados presenta una mayor sintomatología y alteración funcional que los pacientes no infectados.<sup>7</sup>

### Hipertensión pulmonar

Dentro de los pacientes con EPOC, la hipertensión pulmonar (HTP) supone un importante factor pronóstico de mortalidad. Numerosos estudios han determinado que presentar presiones pulmonares elevadas aumenta de manera significativa el riesgo de eventos cardiovasculares incidentes y muerte en población general.<sup>8</sup>

Tradicionalmente se ha considerado que la propia infección por el VIH podría constituir un factor de riesgo para el desarrollo de HTP aunque el mecanismo por el que esto sucedería, más allá de lo justificable por infecciones oportunistas, no es del todo conocido.

La principal limitación a la hora de estudiar la relación entre HTP e infección por el VIH, tanto a niveles de prevalencia como de etiopatogenia o desarrollo es la falta de estudios transversales actuales que ha tenido como consecuencia que las prevalencias aceptadas actualmente en la literatura hayan sido estimadas a partir de datos indirectos provenientes de estudios con claros sesgos de selección.

Uno de estos estudios, presentado por Zola *et al* en 2017, reportaba que hasta un 25% de los pacientes infectados por el VIH a los que se les realiza una ecocardiografía transtorácica presentaban signos de HTP.<sup>9</sup>

Otra importante limitación a la hora de establecer la prevalencia real de HTP en población VIH es la dificultad técnica del diagnóstico. La prueba considerada en la actualidad el patrón oro es el cateterismo derecho. Sin embargo, dada la naturaleza invasiva de la misma, se han establecido criterios de screening por ecocardiografía transtorácica (ETT) como primer paso diagnóstico al tratarse de una prueba no invasiva.<sup>10</sup>

Conviene recordar que la ETT presenta algunas limitaciones cuando se utiliza con este fin. En primer lugar requiere una ventana acústica correcta, algo que puede resultar complicado conseguir en pacientes obesos o con hiperinsuflación importante, ambos escenarios frecuentes en pacientes afectados de EPOC.<sup>11</sup>

En segundo lugar, requiere la presencia de una insuficiencia mitral que permita estimar presiones pulmonares.

Por todo ello se comprende que, cuando se correlacionan los datos de presiones calculadas por ETT con datos obtenidos mediante estimación intervencionista, los resultados no sean óptimos. Esto ha generado en los últimos años una búsqueda de métodos alternativos, fiables y no invasivos de estimación de HTP.<sup>12</sup>

### Papel del ratio Arteria pulmonar - aorta

Recientemente se han publicado varios estudios analizando el papel diagnóstico del ratio entre arteria pulmonar y aorta (AP:A) en la HTP. Las principales ventajas que ofrece este método diagnóstico son la reproducibilidad de la medida, la no necesidad de intervencionismo y la posibilidad de realizar la medida en tomografías torácicas realizadas por cualquier otra causa al no precisar para ello parámetros o condiciones de configuración especiales, lo que diferencia esta medida de otras como la estimación de calcio coronario que precisan protocolos específicos para su estimación.

Atendiendo a los estudios publicados, el ratio AP:A podría resultar un mejor estimador de la HTP que la ETT al haber demostrado correlaciones superiores a las obtenidas mediante ETT en poblaciones seleccionadas.<sup>13</sup> Paralelamente, el ratio AP:A ha demostrado ser también predictor de agudizaciones graves, eventos cardiovasculares incidentes o mortalidad en dichas poblaciones.<sup>13-15</sup>

Hasta el momento, el papel del ratio AP:A como factor diagnóstico y pronóstico se ha validado en poblaciones de pacientes con EPOC moderado-grave (Estadaje GOLD II-IV), en pacientes con neumatía intersticial y en pacientes con insuficiencia cardiaca con fracción preservada.<sup>13-16</sup>

Este valor pronóstico no parece mantenerse cuando se analiza el ratio en población general como demostró el estudio Rotterdam realizado en una muestra de adultos de edad avanzada.<sup>17</sup>

Ningún estudio ha analizado el posible papel del AP:A en una población de pacientes infectados por el VIH, que podrían probablemente beneficiarse especialmente del mismo al presentar más agudizaciones de EPOC, eventos cardiovasculares o incidencia de neoplasias que la población general.

Con el objetivo de establecer la posible utilidad del ratio AP:A en una población de pacientes infectados por el VIH realizamos este trabajo que procedemos a describir a continuación.

## Hipótesis y objetivos

### Hipótesis

El ratio AP:A podría ser un marcador pronóstico de mortalidad en pacientes infectados por el VIH.

### Objetivos

El objetivo principal del estudio sería analizar el papel del ratio AP:A como factor pronóstico de mortalidad.

Los objetivos secundarios del trabajo serían establecer la utilidad del ratio AP:A como factor pronóstico de ingreso hospitalario o incidencia de neoplasia pulmonar

## Material y métodos

### Diseño, población y muestra

Estudio de longitudinal prospectivo de cohorte incluyendo pacientes adultos infectados por el VIH. La cohorte CISEPOC se reclutó en 2008-2009 y está formada por una muestra aleatoria de 285 pacientes representativa de los pacientes seguidos en consultas del Hospital Universitario Son Espases.

Los criterios de inclusión fueron: Edad 40-69 años, firma del consentimiento informado y estabilidad clínica en el momento de inclusión. Los pacientes eran excluidos si presentaban cualquiera de los siguientes criterios:

- Insuficiencia renal cardiaca o hepática (Child-C) grave
- Infección oportunista en los 30 días previos
- Antecedentes de cirugía de resección pulmonar
- Estar recibiendo tratamiento quimioterápico, interferón, inmunosupresores o corticoides sistémicos en el momento de inclusión
- Embarazo
- Índice de Karnofsky <70

Los pacientes incluidos han realizado seguimiento activo cada 4-6 meses. A fin de realizar este estudio, establecimos como punto final de seguimiento el 31-Junio de 2017.

### Pruebas realizadas

Se realizó en todos los pacientes a su inclusión en la cohorte tomografía computarizada torácica de alta resolución (cortes de 2mm, colimación 64\*0,65 mm, 120 kV y 220 mAs en un TC de 64 cortes Philips Brilliance CT), pruebas de función pulmonar que incluían pletismografía, medición de la capacidad de difusión de CO y test broncodilatador, analítica de sangre, cuestionarios estandarizados (mMRC, cuestionario St. George) y test de la marcha de seis minutos de acuerdo a estándares internacionales.

Se registraron variables epidemiológicas, clínicas y asociadas a la infección por el VIH incluyendo recuento CD4 nadir, poblaciones linfocitarias con recuento de CD4, CD8 y su cociente, determinación de carga viral de VIH en suero, coinfección por VHC, estadio clasificatorio del CDC, antecedentes de infección por *Pneumocystis jirovecii* y tuberculosis.

Los pacientes continuaron seguimiento en consultas siendo visitados cada 4-6 meses a criterio de su médico

responsable. Se registraron de manera retrospectiva al finalizar el seguimiento el número de ingresos hospitalarios en 5 años, incidencia de neoplasias de pulmón, incidencia de eventos cardiovasculares, fallecimientos y causa de los mismos.

### Cálculo del enfisema cuantitativo

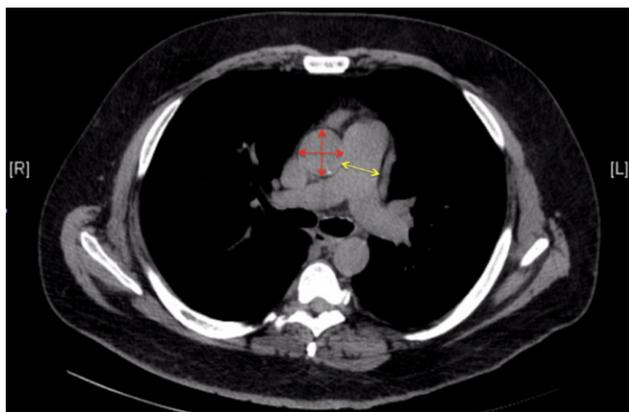
De acuerdo a la literatura vigente, se calculó el grado de enfisema mediante determinación por software propietario (AutoQUANT, Philips Medical Systems, Andover, MA, USA) de las áreas con captación atenuada por debajo de  $-950$  HU (%LLA).

### Cálculo del ratio AP: A

Se realizó el cálculo del ratio AP: A en todos los pacientes incluidos en el estudio de casos y controles que tuvieran realizado un TC torácico en el momento de la inclusión en la cohorte. El cálculo fue realizado por un investigador cegado al resto de variables clínicas o de desenlace de los pacientes. Una muestra de las estimaciones fueron confirmadas por un segunda revisor también ciego al resto de información.

Para la realización del cálculo se aplicó el protocolo de Wells que consiste en medir diámetros aórticos y de arteria pulmonar al nivel de la bifurcación de ésta. La estimación de la medida aórtica se hace mediante la media de dos diámetros perpendiculares realizada en el mismo nivel. La **figura 1** representa un ejemplo de dichas mediciones en un TC incluido en el estudio.

**Figura 1:** Ejemplo de corte de tomografía en el que se realizan las mediciones. Puede apreciarse la bifurcación de la arteria pulmonar a dicho nivel y el corte transversal de aorta. La estimación del ratio se realiza mediante la medición de diámetros aórticos (rojo) y de arteria pulmonar (amarillo). En el caso de la aorta el valor utilizado es la media de dos diámetros perpendiculares.



### Análisis estadístico

Las variables continuas se presentan como media (desviación estándar) o mediana (rango intercuartílico) según su distribución mientras que las categóricas se expresan como porcentajes. La comparación de características basales entre grupos se realiza mediante chi cuadrado, T de Student o U de Mann-Whitney en función de las características y distribución de la variable a comparar.

Realizamos un análisis de sensibilidad para el ratio AP:A en función de la variable dependiente exitus mediante estimación de punto óptimo de corte y cálculo del área bajo la curva en modelos de Característica Operativa del Receptor (Receiver Operating Characteristic: ROC).

Se realizó también análisis de supervivencia multivariado (Regresión logística de Cox con cálculo de HR) para estimación de riesgos en las variables explicativas a estudio.

En el modelo multivariado se incluyen las variables significativas en el análisis univariado así como variables consideradas importantes por la evidencia existente en la literatura.

### Consideraciones éticas

Este estudio ha sido aprobado por el comité de ética de las Islas Baleares. Todos los pacientes incluidos firmaron consentimiento informado.

## Resultados

### Población incluida

Se incluyen en este estudio 187 pacientes (total de pacientes con medidas del ratio AP:A disponibles). Las principales características de los pacientes se muestran en la **tabla I**. El tiempo medio de seguimiento fue de  $7.65 \pm 1.72$  años para un total de 1430 pacientes-año.

### Mortalidad y causas

Desde la inclusión en la cohorte hasta el 15/6/2017 se produjeron un total de 27 exitus (tasa: 18.88 fallecimientos por 1000 pacientes-año). Las causas de los mismos fueron: 12 neoplasias (5 pulmonares, 3 hepatocarcinomas, 2 colónicas, 2 pancreáticas), 3 eventos cardiovasculares, 3 causas infecciosas, 2 descompensaciones de cirrosis y 7 pacientes sin causa conocida.

### Prevalencia de EPOC

Se objetivó limitación al flujo aéreo en un total de 46 pacientes (24.47%) incluidos en este trabajo, sin diferencias significativas entre pacientes en función de ser exitus o no durante el seguimiento (26.9% vs 24.1%).

De los pacientes que cumplían criterios de EPOC tras prueba broncodilatadora (22.36%), su estadije de acuerdo a la clasificación GOLD sería de 52.2% estadio I, 47.8% estadio II, ningún paciente en estadios III-IV.

### Situación funcional basal

En el momento de inclusión se realizó a los pacientes test de la marcha de 6 minutos además de cuestionario de St. George de sintomatología respiratoria. El 65% de los pacientes incluidos superaban el 90% del valor estimado de referencia en metros en el test de la marcha y tan sólo un 25% de los pacientes presentaban valores superiores al 20% en el puntaje del cuestionario.

Tabla I: Características basales de los pacientes en el momento de inclusión en función de desenlace.

Variable	vivos n =160	exitus n= 27	p
Sexo (Hombres, %)	77.8%	92.6%	0.06
Edad (media ± DE)	48.92 ±6.65	52.88±7.11	0.07
Seguimiento (años) (media ± DE)	8.23 ±0.38	3.96 ± 2.33	na
Tabaquismo (%)			
• activo	61.1%	76.92%	0.20
• previo	26.5%	18.51%	
• nunca fumador	12.3%	3.7%	
Consumo de cocaína/heroína (activo o previo, %)	45.1%	40.74%	0.54
Coinfección por VHC (%)	34%	44.4%	0.54
Hipertensión (%)	14.2%	18.5%	0.56
Diabetes (%)	12.3%	29.6%	0.03
Dislipidemia (%)	38.9%	48.1%	0.40
Índice de Masa corporal (kg/m <sup>2</sup> ) (media ± DE)	24.03 ±3.84	24.34 ± 5.02	0.72
CD4 nadir (cels/ml), (mediana, RIQ)	259 (100-450)	235 (150-450)	0.30
CD4 basales (cels/ml), (mediana, RIQ)	541 (385-803)	430 (361-792)	0.07
cd4/cd8	0.77± 0.43	0.79 ± 0.51	0.88
Carga viral VIH <50 copias/ul (%)	90.12%	96.29%	0.39
Estadio CDC (%)			
• A	42%	44.4%	0.20
• B	29%	18.51%	
• C	29%	37.04%	
Enfisema cuantitativo (%) (mediana, RIQ)	0.16 (0.05-0.43)	0.22 (0.09-0.94)	0.25
Medida diámetro Aorta (mm) (media ± DE)	31.55 ± 3.82	32.39 ± 3.19	0.30
Medida diámetro pulmonar (mm) (media ± DE)	26.18 ± 3.44	25.78 ± 3.87	0.60
Ratio (media ± DE)	0.83 ± -0.11	0.79 ± -0.10	0.10
Test de la marcha de 6 m			
• Distancia (m) (media ± DE)	583.52 ± 65.34	570.22 ±68.54	0.37
• % referencia (media ± DE)	93.90 ± 13.69	94.99 ± 13.34	0.72
Puntuación St. George (%) (mediana, RIQ)	6.15 (1.78-19.48)	13.7 (3.22-23.75)	0.04
FEV1/FVC (media ± DE)	75.42 ± 8.82	74.87± 11.01	0.77
DLCO (% sobre referencia) (media ± DE)	82.0 ±16.16	69.34 ± 17.31	<0.01

### Ratio AP:A

El ratio medio en la muestra de pacientes fue de  $0.83 \pm 0.11$  no encontrándose diferencias significativas pacientes en función de desenlace vital. El 8% de los pacientes incluidos presentaban un ratio  $\geq 1$  (punto de

corte considerado en la literatura como diagnóstico de HTP). En la **figura 2** se muestra el ratio estratificando por desenlace y por grado de EPOC de acuerdo a las guías GOLD.

Figura 2A: Histograma del Ratio AP:A en función de mortalidad

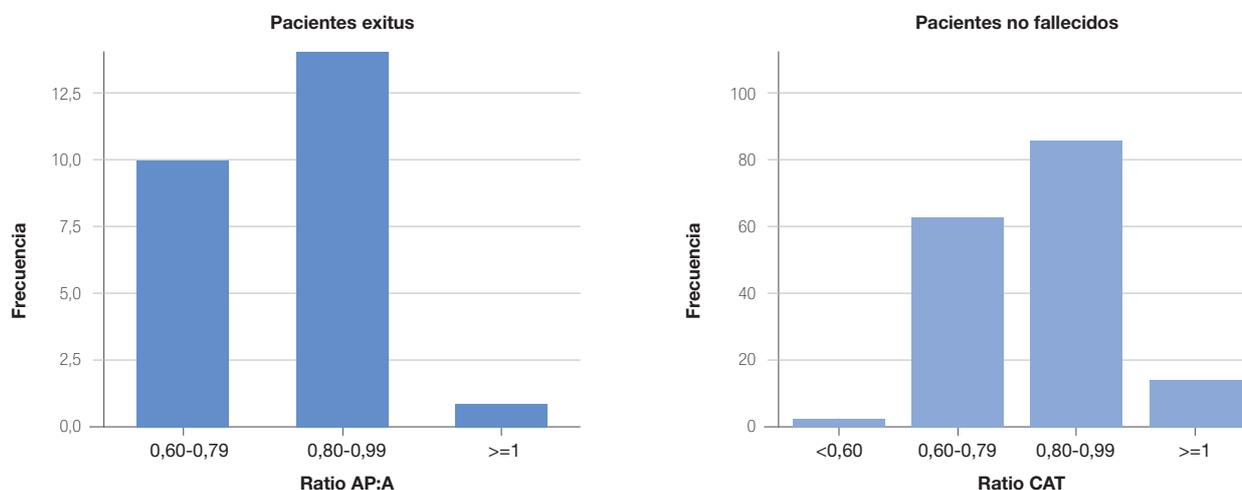
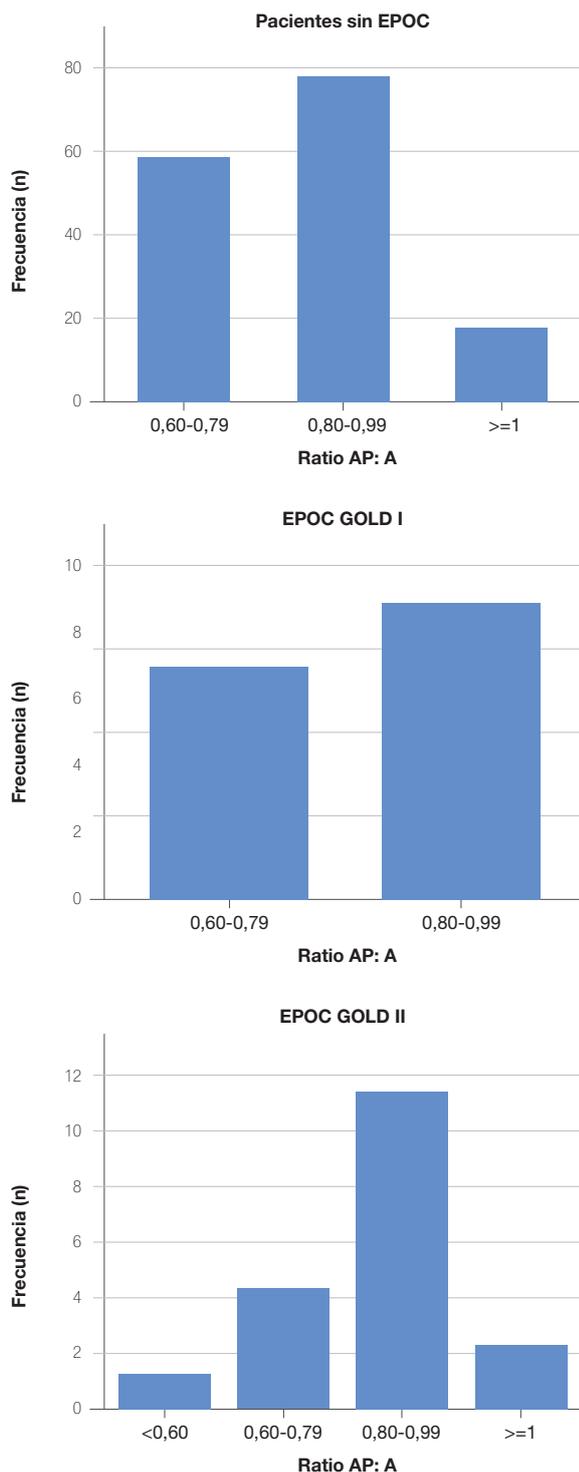


Figura 2B: Histograma del Ratio AP:A en función de presentar EPOC



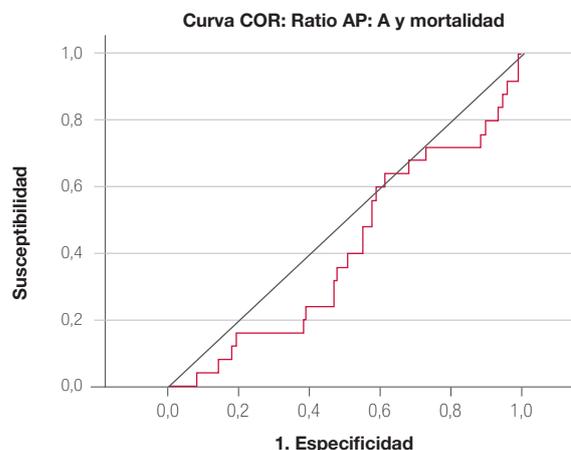
### Estimación del punto de corte ideal de AP:A

Se realizó un análisis de sensibilidad y especificidad para intentar establecer un punto óptimo de corte del ratio AP:A en nuestra muestra completa en relación a mortalidad.

No encontramos ningún punto de corte para el que la sensibilidad y especificidad del ratio AP:A fuera superior al 60% en ambas. Estableciendo el punto de corte en

0.90 se obtenía una especificidad del 78% pero con una sensibilidad tan sólo del 16%. Así mismo, un corte establecido en el ratio >0.75 tendría una sensibilidad del 72% pero una especificidad del 24%. El modelo obtenía un valor de área bajo la curva de 0.41 (Figura 3), resultando ineficaz como predictor único de mortalidad.

Figura 3: Curva COR (Área bajo la curva de 0.41, p=0.15)



Realizamos posteriormente cálculo de curva ROC en el subgrupo de pacientes con EPOC sin encontrar diferencias respecto al modelo global (área bajo la curva 0.405). No realizamos subanálisis en función de clasificación GOLD al tener nuestro estudio un tamaño muestral insuficiente.

### Análisis de supervivencia multivariante de Cox

Finalmente realizamos un análisis multivariado incluyendo como covariables aquellas que presentaron en el análisis univariado valores de  $p < 0.10$  o que hubieran sido descritas previamente como significativas en la literatura como relevantes. Utilizamos un modelo estadístico basado en la entrada condicional de variables con el que apreciamos que las únicas variables asociadas estadísticamente con la mortalidad en nuestro caso eran presentar diabetes (HR 2.61 IC 95%: 1.07-6.36,  $p=0.03$ ) y tener DLCO inferiores (HR 0.95 IC95%: 0.93-0.98,  $p < 0.01$ ).

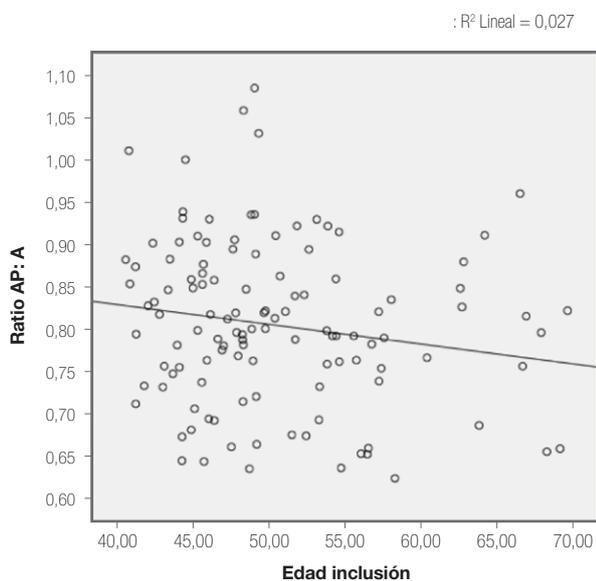
El ratio AP:A en nuestra muestra resultaba presentar un efecto protector con un HR una significación no estadística (Tabla II).

Tabla II: Datos de la regresión de Cox al mantener las variables significativas en multivariado e introducir la variable Ratio AP:A

	Sig.	HR	95,0% IC para HR	
			Inferior	Superior
Diabetes	,034	2,613	1,073	6,362
DLCO (%)	,000	,952	,929	,976
Ratio PA:A	,099	,043	,001	1,821

Este teórico efecto protector en nuestro modelo se justifica por una correlación inversa entre la edad de inclusión y el ratio AP:A, presentando los pacientes más jóvenes ratios superiores como puede verse en el diagrama de dispersión mediante regresión logística en la **figura 4**. Esta correlación obtenía un coeficiente de Pearson de  $-0.245$  ( $p=0.001$ )

**Figura 4:** Diagrama de dispersión de las variables Ratio AP: A y edad



### Análisis del ratio AP:A en objetivos secundarios del estudio

Durante el seguimiento se registraron 7 neoplasias de pulmón incidentes. Al comparar los ratios AP:A de los pacientes con neoplasia pulmonar versus aquellos pacientes que no la desarrollan no apreciamos diferencias significativas ( $0.78$  vs  $0.82$ ,  $p=0.27$ ).

Tampoco encontramos diferencias en el ratio de los pacientes en función de haber tenido o no ingresos hospitalarios en 5 años ( $0.83$  vs  $0.84$ ,  $p=0.73$ ).

### Discusión

Nuestro trabajo intenta valorar la posible utilidad del Ratio AP:A como marcador pronóstico en una cohorte de pacientes infectados por el VIH. A tenor de los resultados obtenidos, podemos concluir que en una muestra de pacientes de mediana edad como la nuestra no resulta un parámetro útil como marcador pronóstico de mortalidad.

No hemos podido establecer un punto de corte en el que los valores de sensibilidad y especificidad para la variable en estudio fueran aceptables. Tampoco hemos evidenciado un valor predictivo de mortalidad en nuestro

modelo multivariado de supervivencia. Estos resultados serían congruentes con los publicados en cohortes de población general sin enfermedades pulmonares o cardíacas avanzadas.

Posteriormente, en análisis post hoc hemos analizado la posible utilidad del Ratio AP:A en un subgrupo de pacientes con EPOC (incluyendo cualquier estadio de la enfermedad) sin obtener tampoco valores significativos predictivos a diferencia de cohortes publicadas en las que sí hallan estas relaciones. Creemos que en nuestro caso esto se justifica por el relativo bajo nivel de gravedad de EPOC presente en la muestra (ningún paciente en estadios III-IV de la clasificación GOLD) comparada con los estudios publicados hasta la fecha.

Tampoco hemos observado utilidad pronóstica para el desarrollo de neoplasias de pulmón ni el presentar ingresos hospitalarios en 5 años.

Destaca además en nuestro trabajo la baja proporción de pacientes con un Ratio AP:A  $\geq 1$ . Considerando que tradicionalmente este es el valor de corte propuesto como óptimo en el cribado de HTP podría deducirse que la prevalencia de HTP en nuestra muestra es baja. A favor de esta afirmación estaría que los pacientes incluidos en el estudio presentan una situación funcional relativamente conservada, algo poco probable si la prevalencia de HTP fuera similar a las cifras publicadas en la literatura del 25%.

Los datos obtenidos en el modelo multivariado de regresión respecto al papel pronóstico de la DLCO y la presencia de DM en nuestra cohorte son también congruentes con la literatura existente en este campo, así como la mayor mortalidad en función de edad y sexo masculino que en nuestro caso no ha alcanzado niveles significativos.

Ninguna variable relacionada con la infección VIH ha demostrado ser predictiva de mortalidad en nuestra cohorte en el análisis multivariado. Probablemente esto se deba al tipo de muestra incluida, con más de un 90% de los pacientes en estado de supresión virológica y con cifras de poblaciones linfocitarias de CD4 elevadas.

Conviene analizar finalmente las fortalezas y limitaciones de nuestro trabajo. Se trata de un estudio realizado en una muestra aleatorizada de pacientes infectados por el VIH, bien caracterizada a nivel clínico y con un correcto seguimiento. Las mediciones de la variable en estudio se han realizado por un único revisor cegado al resto de información clínica y todos los TC se han realizado utilizando el mismo equipo y protocolo. Con estas medidas creemos haber minimizado posibles sesgos de medida.

Las principales limitaciones de nuestro trabajo vienen devenidas de los criterios de inclusión y exclusión em-

pleados. Al haberse excluido inicialmente pacientes con cardiopatía, nefropatía o hepatopatía avanzadas hemos seleccionado una muestra en la que probablemente el valor del Ratio AP:A sea inferior a lo obtenido si se aplica sin estos criterios dado que es en esos subgrupos de pacientes en los que el Ratio AP:A es un mejor predictor de acuerdo a lo publicado hasta ahora.

Por ello no podemos descartar que en poblaciones selec-

cionadas de pacientes infectados por el VIH y comórbidos avanzados esta medida pudiera tener un valor pronóstico.

## Conclusiones

En nuestro estudio el ratio AP:A no ha demostrado ser predictor de mortalidad, ingresos hospitalarios a cinco años ni incidencia de neoplasias pulmonares en una población aleatorizada de pacientes infectados por el VIH.

## Bibliografía

1. Sara Croxford, Aileen Kitching, Sarika Desai, *et al.* Mortality and causes of death in people diagnosed with HIV in the era of highly active antiretroviral therapy compared with the general population: an analysis of a national observational cohort. *Lancet Public Health*.2017; 2(1): e35-e46
2. Sampérez G, Guerrero D, López M, Valera JL, Iglesias A, Ríos A, *et al.* Prevalence of and risk factors for pulmonary abnormalities in HIV-infected patients treated with antiretroviral therapy. *HIV Med*, 2014 15: 321-9
3. Pefura-Yone EW, Fodjeu G, Kengne AP, Roche N, Kuaban C. Prevalence and determinants of chronic obstructive pulmonary disease in HIV infected patients in an African country with low level of tobacco smoking. *Respir Med*. 2015;109(2):247-5
4. Vogelmeier CF, Criner GJ, Martínez FJ, Anzueto A, Barnes PJ, Bourbeau J, *et al.* Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report. *Am J Respir Crit Care Med*. Published online January 27, 2017. <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/rccm.201701-0218PP>. Accessed February 2, 2017
5. Triplette M, Brown ST, Goet MB. Chronic obstructive pulmonary disease and mortality in HIV. Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), February 13-16, 2017, Seattle. Abstract 658
6. Chung NPY, Ou X, Khan KMF, Salit J, Kaner RJ, Crystal RG. HIV Reprograms Human Airway Basal Stem/Progenitor Cells to Acquire a Tissue Destructive Phenotype. *Cell reports*. 2017;19(6):1091-100.
7. Triplette M, Attia E, Akgun K, Campo M, Rodriguez-Barradas M, Pivavath S, *et al.* The differential impact of emphysema on respiratory symptoms and six-minute walk distance in HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2016 Jul 7
8. Hoepfer MM, Kramer T, Pan Z, Eichstaedt CA, Spiesshoefer J, Benjamin N, *et al.* Mortality in pulmonary arterial hypertension: prediction by the 2015 European pulmonary hypertension guidelines risk stratification model. *The European Respiratory Journal*. 2017;50(2):1700740.
9. Zola C, Koethe J.R., Xu M. Prevalence and prognostic impact of pulmonary hypertension in HIV-infected adults. Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), February 13-16, 2017, Seattle. Abstract 621
10. Galiè N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, *et al.* 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J*. 2016 Jan 1;37(1):67-119.
11. Arcasoy SM, Christie JD, Ferrari VA, Sutton MS, Zisman DA, Blumenthal NP, *et al.* Echocardiographic Assessment of Pulmonary Hypertension in Patients with Advanced Lung Disease, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2003 167(5): 735-40
12. Lau EMT, Giannoulatou E, Celermajer DS, Humbert M. Epidemiology and treatment of pulmonary arterial hypertension. *Nat Rev Cardiol*. 2017;14(10):603-14
13. Iyer AS, Wells JM, Vishin S, Bhatt SP, Wille KM, Dransfield MT. CT Scan-Measured Pulmonary Artery to Aorta Ratio and Echocardiography for Detecting Pulmonary Hypertension in Severe COPD. *Chest*. 2014;145(4):824-32.
14. Rahaghi FN, Wells JM, Come CE, De La Bruere IA, Bhatt SP, Ross JC, *et al.* Arterial and Venous Pulmonary Vascular Morphology and Their Relationship to Findings in Cardiac Magnetic Resonance Imaging in Smokers. *J Comput Assist Tomogr*. 2016; 40(6):948-52.
15. Wells JM, Iyer AS, Rahaghi FN, Bhatt SP, Gupta H, Denney TS, *et al.* Pulmonary artery enlargement is associated with right ventricular dysfunction and loss of blood volume in small pulmonary vessels in chronic obstructive pulmonary disease *Circ Cardiovasc Imaging*. 2015;8(4). pii: e002546
16. Wells JM, Washko GR, Han MK, Abbas N, Nath H, Mamary AJ, *et al.* Pulmonary arterial enlargement and acute exacerbations of COPD. *N Engl J Med*. 2012 6;367(10):913-21
17. Terzikhan N, Bos D, Lahousse L, Wolff L, Verhamme KMC, Leening MJG, *et al.* Pulmonary artery to aorta ratio and risk of all-cause mortality in the general population: the Rotterdam Study. *Eur Respir J*. 2017; 15;49(6). pii: 1602168

# Búsqueda de nuevas dianas terapéuticas de cáncer de pulmón

*Search for new therapeutic targets for lung cancer*

**Pedro P. Medina Vico**

*Grupo CTS-993. Centro de investigaciones Genómicas y oncológicas (GenyO)*

## Correspondencia

Pedro P. Medina Vico

Centro de investigaciones Genómicas y oncológicas (GenyO).

Av. de la Ilustración, 114, 18007 - Urb. los Vergeles, Granada

E-mail: pedro.medina@genyo.es

**Recibido:** 11 - I - 2018

**Aceptado:** 22 - III - 2018

doi: 10.3306/MEDICINABALEAR.33.02.19

## Resumen

En cáncer de pulmón, una de las terapias dirigidas más exitosas, son las que inhiben a los protooncogenes *ErbB* (especialmente a *EGFR* y a *ErbB2*). Actualmente se están ensayando la inhibición de estos oncogenes mediante pequeñas moléculas (*erlotinib*, *lapatinib*, gefitinib) o mediante anticuerpos monoclonales (*cetuximab*, *trastuzumab*, *pertuzumab*) consiguiéndose un éxito relativo para tumores metastásicos de célula no pequeña. Interesantemente estas terapias parecen ser más efectivas cuando los oncogenes se encuentran amplificados. Teniendo en cuenta estas consideraciones, el objetivo principal de este trabajo, es la búsqueda de regiones cromosómicas amplificadas en cáncer de pulmón que puedan albergar nuevos oncogenes, que nos ayuden a profundizar en el conocimiento del cáncer y sobre los que podamos desarrollar futuros fármacos que sirvan como terapias dirigidas. Para tal propósito hemos combinado dos tipos de plataformas de análisis masivo de información genética: microarrays de hibridación genómica comparada (CGH) y microarrays de expresión para analizar el genoma de 8 líneas celulares de cáncer de pulmón. Se comparó directamente el número de copias de ADN y los niveles de expresión de ARNm de más de 8000 genes para identificar nuevos oncogenes amplificados funcionalmente. La línea celular Calu3 que contiene una amplificación cromosómica conocida de *ErbB2*, en la región 17q12, se utilizó como control positivo. Además de confirmar la amplificación en 17q en las células Calu3, nuestros datos revelaron claramente la presencia de cuatro amplicones independientes en los cromosomas 5p13, 6p21, 11q13, 19q13 y en la mayoría de los casos de forma concomitante con un aumento en la expresión génica. Ensayos de fluorescencia *in situ* (FISH) en las líneas celulares confirmaron la presencia de amplificación génica (más de 10 copias) en estas regiones cromosómicas. Además de las líneas celulares, la presencia y la frecuencia de las alteraciones se evaluó adicionalmente en 26 tumores primarios de pulmón mediante FISH. Nuestros resultados mostraron una recurrencia en la amplificación cromosómica en tumores primarios: 8 % (en la región cromosómica 5p12), 4 % (6p21), 4 % (11q13.2), 2 % (17q12) y 2 % (19q13). Un análisis más detallado de los genes contenidos en estas regiones revelaron posibles candidatos a ser nuevos oncogenes en cáncer de pulmón. En conjunto, estos los datos sugieren que estas regiones cromosómicas de ampliación pueden albergar posibles oncogenes implicados en la carcinogénesis pulmonar sobre los cuales se podría diseñar de nuevos fármacos de utilidad terapéutica.

**Palabras clave:** protooncogenes *ErbB*, cáncer de pulmón, dianas terapéuticas.

## Abstract

In lung cancer, one of the most successful targeted therapies are those that inhibit *ErbB* protooncogenes (especially *EGFR* and *ErbB2*). Are currently being tested inhibition of these oncogenes by small molecules (*erlotinib*, *lapatinib*, gefitinib) or monoclonal antibodies (*cetuximab*, *trastuzumab*, *pertuzumab*) achieving relative success for metastatic tumors of non- small cell. Interestingly, these therapies are most effective when these oncogenes are amplified. Given these considerations, the main aim of this work is the search for chromosomal regions amplified in lung cancer that can accommodate new oncogenes, to help us deepen knowledge about cancer and future drugs that we develop to serve as targeted therapies.

To search for chromosomal regions that could harbour new oncogenes amplified in lung tumors we have performed high-resolution CGH (Comparative Genome Hybridization), analysis on cDNA microarrays in 8 lung cancer cell lines. We directly compared DNA copy number and mRNA expression levels of over 8000 genes to identify novel amplicons and the candidate oncogenes that are targeted. The Calu-3 cells that carry gene amplification at the 17q12 region, a previously reported and well known amplicon that targets the *ErbB2* oncogene, was included in the study as a positive control. In addition of confirming the amplification at 17q in the Calu-3 cells, our data clearly unveiled the presence of four independent amplicons at chromosomes 5p13, 6p21, 11q13, and 19q13, in most cases concomitantly with an increase in gene expression. FISH analysis in the cell lines confirmed the presence of gene amplification (more than 10 copies) at these regions. In addition to cell lines, the presence and frequency of the alterations was further evaluated in 26 lung primary tumors by FISH analysis. Our results showed that the frequency of amplification at these regions in the primary tumors was as follows: 8% (at chromosome 5p12), 4% (at chromosome 6p21), 4% (at chromosome 11q13.2), 2% (at chromosome 17q12) and 2% (at chromosome 19q13). Further analysis of the genes in these regions revealed potential candidates for new oncogenes in lung cancer. Taken together, the data suggests that these amplicons may harbour potential oncogenes implicated in lung carcinogénesis that could be used for drug targeting. Overall, our results illustrate how the amplification provides a powerful approach to highlight genes with an important role in cancer.

**Keywords:** *ErbB* protooncogenes, lung cancer, therapeutic targets.

## Introducción

### Oncogenes, amplificación génica y fármacos para terapias dirigidas.

Tal y como se ha mostrado en apartados anteriores, de una forma general, los genes importantes en cáncer pueden dividirse en dos tipos: genes supresores tumorales, que controlan negativamente el crecimiento tumoral y los oncogenes, que promueven el crecimiento tumoral. Por ello, y como parte del desarrollo tumoral, las células adquieren de forma selectiva una pérdida de función de los genes supresores tumorales y una adquisición de oncogenes (mediante la conversión de sus precursores naturales, los proto-oncogenes).

Los genes supresores tumorales pueden perder su función mediante los siguientes mecanismos:

- 1) La pérdida completa de sus regiones codificantes,
- 2) La adquisición de mutaciones inactivadoras.
- 3) La represión transcripcional (por ejemplo, mediante hipermetilación de su promotor).

Por otra parte, un proto-oncogén puede transformarse en un oncogén, mediante varios mecanismos (**Figura I1**):

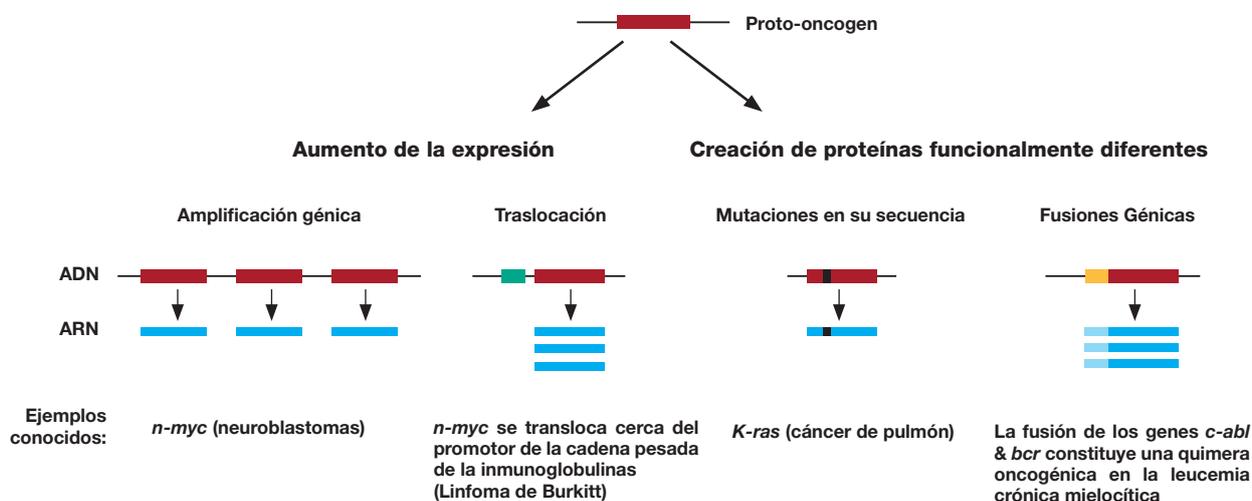
- 1) Creación de proteínas funcionalmente diferentes: por la adquisición de mutaciones activadoras (los protooncogenes *ras* se activan permanentemente mediante mutaciones puntuales), o bien, mediante la formación de quimeras oncogénicas mediante fusión génica (la fusión de los genes *c-abl* y *bcr* origina un oncogén en la leucemia mieloide crónica).
- 2) Sobreexpresión asociada a la amplificación génica (*n-myc* en neuroblastomas) o a translocaciones (*c-myc* en los linfomas de Burkitts, suele translocarse cerca del promotor del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas, lo que aumenta su expresión).

Tanto supresores tumorales como oncogenes son objeto de estudio por parte de la terapia anti-oncogénica actual. Las terapias dirigidas, son las destinadas a afectar exclusivamente la proliferación tumoral, preferibles frente a las terapias tradicionales, que interfieren en el crecimiento de las células que se dividen rápidamente tumorales o no.

Con la tecnología actual, es más exitoso suprimir el efecto de oncogenes que recuperar la pérdida de función de los supresores, por lo que las terapias dirigidas que están surgiendo actúan inhibiendo oncogenes. El ejemplo más representativo de terapia dirigida se trata del *imatinib mesylate*, una pequeña molécula capaz de inhibir a la quinasa oncogénica *abl-bcr* propia de la leucemia mieloide crónica. Así, el tratamiento con *imatinib mesylate* es capaz de provocar una remisión citogenética completa en cerca del 90% de los pacientes de leucemia mieloide crónica tras 15 meses de tratamiento (Deininger and Druker 2003).

A día de hoy no existen muchas terapias dirigidas en el cáncer de pulmón, y hasta hora solo se han mostrado efectivas las que las que tratan de reducir los efectos cancerígenos de los oncogenes, más que recuperar el efecto de los genes supresores. En cáncer de pulmón, una de las terapias dirigidas más exitosas, son las que inhiben a los protooncogenes ErbB (especialmente a EGFR y a ErbB2/Her2) que se encuentran sobre expresados en alrededor del 10% de tumores primarios (Grob, Kannengiesser et al. 2012). Actualmente se están ensayando la inhibición de estos oncogenes mediante pequeñas moléculas (erlotinib, lapatinib, gefitinib) o mediante anticuerpos monoclonales (cetuximab, trastuzumab, pertuzumab) consiguiéndose un éxito relativo para tumores metastásicos de célula no pequeña (Swanton, Futreal et al. 2006; Bruheim, Sandvold et al. 2013). Ha de resaltarse que estas terapias son más

**Figura I1:** Transformación de proto-oncogenes en oncogenes: Los proto-oncogenes pueden transformarse en oncogenes mediante la adquisición de mutaciones que les haga funcionalmente diferentes o mediante un aumento de la expresión.



efectivas cuando los oncogenes se encuentran amplificados (Cappuzzo, Varella-Garcia et al. 2005; Tsao, Sakurada et al. 2005).

### Amplificación génica y cáncer

La amplificación génica, es un proceso mediante el cual aumenta el número de copias de una región cromosómica de forma diferencial al resto del genoma. Originalmente se identificó como un mecanismo por el cual algunas líneas celulares adquirían resistencia a compuestos inhibidores del crecimiento (Alt, Kellems et al. 1978). En cáncer se observó por primera vez en los genes *myc*, a comienzos de la década de los ochenta (Dalla-Favera, Wong-Staal et al. 1982). En principio, se pensó que se trataba de una excepción, aunque posteriormente la lista de genes amplificados en tumores (sobretudo sólidos) y en líneas celulares ha ido aumentando.

En el caso concreto del cáncer de pulmón se han identificado como principales genes alterados por amplificación, los genes de la familia *myc* (especialmente *c-myc* y *l-myc*) y los genes de la familia *ErbB* (*ErbB2* y *EGFR*) con frecuencias inferiores al 10%.

Hasta la fecha, la técnica más empleada para la detección de los cambios en el número de copias de ADN a lo largo de todo el genoma, ha sido la Hibridación Genómica Comparada (CGH), desarrollada en 1992. Dicha técnica compara el número de copias de ADN de dos muestras distintas que previamente se han marcado con fluorocromos diferentes. Por ejemplo, el ADN tumoral, marcado en verde y el ADN normal, marcado en rojo. Ambos ADNs se mezclan en cantidades equimolares y se realiza una hibridación *in situ* competitiva sobre cromosomas metafásicos normales. Cuando no existen alteraciones en el número de copias del ADN, la cantidad de ADN marcado en rojo y verde es la misma, por lo que el resultado final aparece en amarillo (mezcla 1:1 de rojo y verde). Por el contrario, si el tumor contiene ganancia de material genético en determinadas regiones, la hibridación de esa zona resultará en una mayor proporción de fluorocromo del tumor (verde). Por el contrario, si el tumor contiene una delección (pérdida), la región delecionada del tumor aparecerá en rojo. La CGH permite, por tanto, la detección de ganancia y pérdidas de regiones cromosómicas en todo el genoma del tumor y se ha aplicado extensamente durante los últimos años a los más diversos tipos de tumores, mostrando su gran utilidad en la búsqueda de regiones cromosómicas con alteración en el número de copias. Sin embargo presenta el inconveniente de tener una resolución limitada ya que es incapaz de detectar alteraciones que abarquen menos de 7-10 Mb.

En los últimos años se ha podido aumentar la resolución de esta técnica mediante la utilización de los microarrays de CGH, que combinan la tecnología de

análisis masivo de los microarrays (Pinkel, Seagraves et al. 1998), la técnicas de hibridación comparada de la CGH y los datos de secuencias y posiciones aportados por el Proyecto Genoma Humano. De esta forma, los microarrays de CGH se utilizan para comparar masivamente secuencias concretas de ADN de muestras diferentes de las que se conoce su posición exacta en el genoma. Esto posibilita una mayor resolución, tan sólo limitada por el número de secuencias impresas en el microarray y la distancia genómica que existe entre ellas. Así, pueden alcanzarse resoluciones entorno a la 0,5 Mb. En principio, como plataforma para los microarrays de CGH, se ha estado utilizando matriz de ADNc (Pollack, Perou et al. 1999), aunque actualmente están emergiendo las matrices de ADN desarrolladas *ex profeso* para dicha técnica.

### Objetivos

A pesar de los avances actuales, el cáncer de pulmón es la primera causa de muerte por cáncer en nuestro país. Actualmente no existen terapias eficaces que logren disminuir la mortalidad de este tipo tumoral y menos del 12,5% de los pacientes españoles logran sobrevivir cinco años tras su diagnóstico. Es necesario aumentar los esfuerzos para comprender los mecanismos que contribuyen a la aparición y evolución del cáncer pulmonar, con el fin que puedan repercutir efectivamente sobre los pacientes.

El análisis masivo genómico se ha mostrado como una herramienta capaz de ayudar a la comprensión del proceso carcinogénico y como una herramienta útil para la selección de dianas terapéuticas que pueden ayudar al diseño de fármacos.

Las terapias dirigidas son las destinadas a afectar primordialmente la proliferación tumoral. Son preferibles frente a las terapias convencionales, que interfieren en el crecimiento de las células que se dividen rápidamente tumorales o no, siendo en principio más efectivas y con menos efectos secundarios.

En cáncer de pulmón, una de las terapias dirigidas más exitosas, son las que inhiben a los protooncogenes *ErbB* (erlotinib, lapatinib, gefitinib, cetuximab, trastuzumab, pertuzumab, etc) que se encuentran sobre-expresados con cierta frecuencia en tumores primarios. Como se mencionó en la introducción, estas terapias son más efectivas cuando los oncogenes se encuentran amplificados genéticamente. Teniendo en cuenta estas consideraciones, el objetivo principal de este trabajo, es la búsqueda de regiones cromosómicas amplificadas en cáncer de pulmón que puedan albergar nuevos oncogenes, que nos ayuden a profundizar en el conocimiento del cáncer y sobre los que podamos desarrollar futuros fármacos que sirvan como terapias dirigidas.

## Materiales y métodos

### Microarrays de ADNc de expresión

Por microarrays de ADNc se conoce a una técnica de análisis masivo de expresión génica que utiliza como soporte un vidrio en donde se han depositado una matriz de puntos que contienen secuencias de ADNc conocidas. En los microarrays de expresión se comparan dos ARN de diferente procedencia. Para ello el ARN se retrotranscribe a ADNc y se marcan con fluorocromos diferentes, por ejemplo, rojo (Cy5) y verde (Cy3). Posteriormente ambos ADNc marcados se hibridan de forma competitiva sobre el portaobjetos que contiene la matriz de ADNc, se lava y se recoge la fluorescencia mediante un escáner. Las intensidades de fluorescencia recogidas en el canal rojo serán proporcionales al ARN inicial que habíamos marcado en rojo, e igualmente para el verde. De esta forma pueden compararse miles de transcritos de ARN diferentes a la vez, tantos como puntos de secuencias diferentes haya en el microarray.

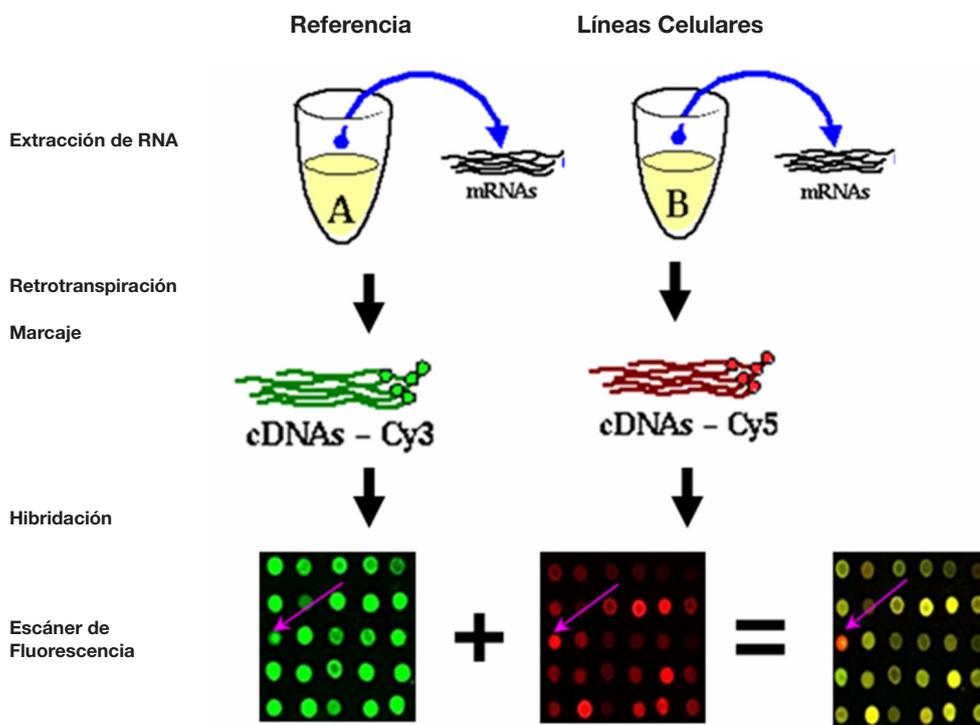
El OncoChip es un microarray de ADNc que especialmente ha sido diseñado que contenga genes implicados en el cáncer. Incluye un núcleo central de 2.489 genes relevantes en el cáncer junto con otros genes implicados en la respuesta a drogas, genes específicos de tejido y genes control hasta sumar un total de 6386 genes.

En el presente estudio (**Figura M1**), para realizar los ensayos de microarrays de expresión se partió 35 µg de ARN total. En un primer paso, el ARN se retrotranscribió y marcó usando el enzima "Superscript II ARN-Hase Reverse Transcriptase" (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Se utilizó el fluorocromo Cy3-dUTP (verde) para marcar de un ARN referente comercial (Unniversal Human Referente RNA, Stratagene) y Cy5-dUTP (rojo) para marcar el ARN de las líneas celulares problema. Los ADNc se purificaron mediante "CyScribe GFX purification kit" (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). Posteriormente se combinaron los ADNc control y problema, se añadió el bloqueante "Human Cot 1 DNA" (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y se precipitaron con etanol.

A continuación el cDNA marcado se desnaturalizó y se hibridó en el cristal utilizando como tampón de hibridación "Slide Hyb#1" (Ambion, Austin, Tx, USA). Se incubó 17h a 55°C. Finalmente, el cristal se lavó y se escaneó utilizando Scanarray 5000 XL (GSI Lumonics Kanata, Ontario, Canada).

Las imágenes escaneadas se cuantificaron y normalizaron con el programa GenePix (Axon instruments Inc., Union City, CA, USA) y los datos para el estudio se extrajeron con la ayuda del paquete bioinformático: (<http://gepas.bioinfo.cnio.es/cgi-bin/preprocess>) (Herrero, Al-Shahrour et al. 2003).

Figura M1: Desarrollo de un Microarray de Expresión.

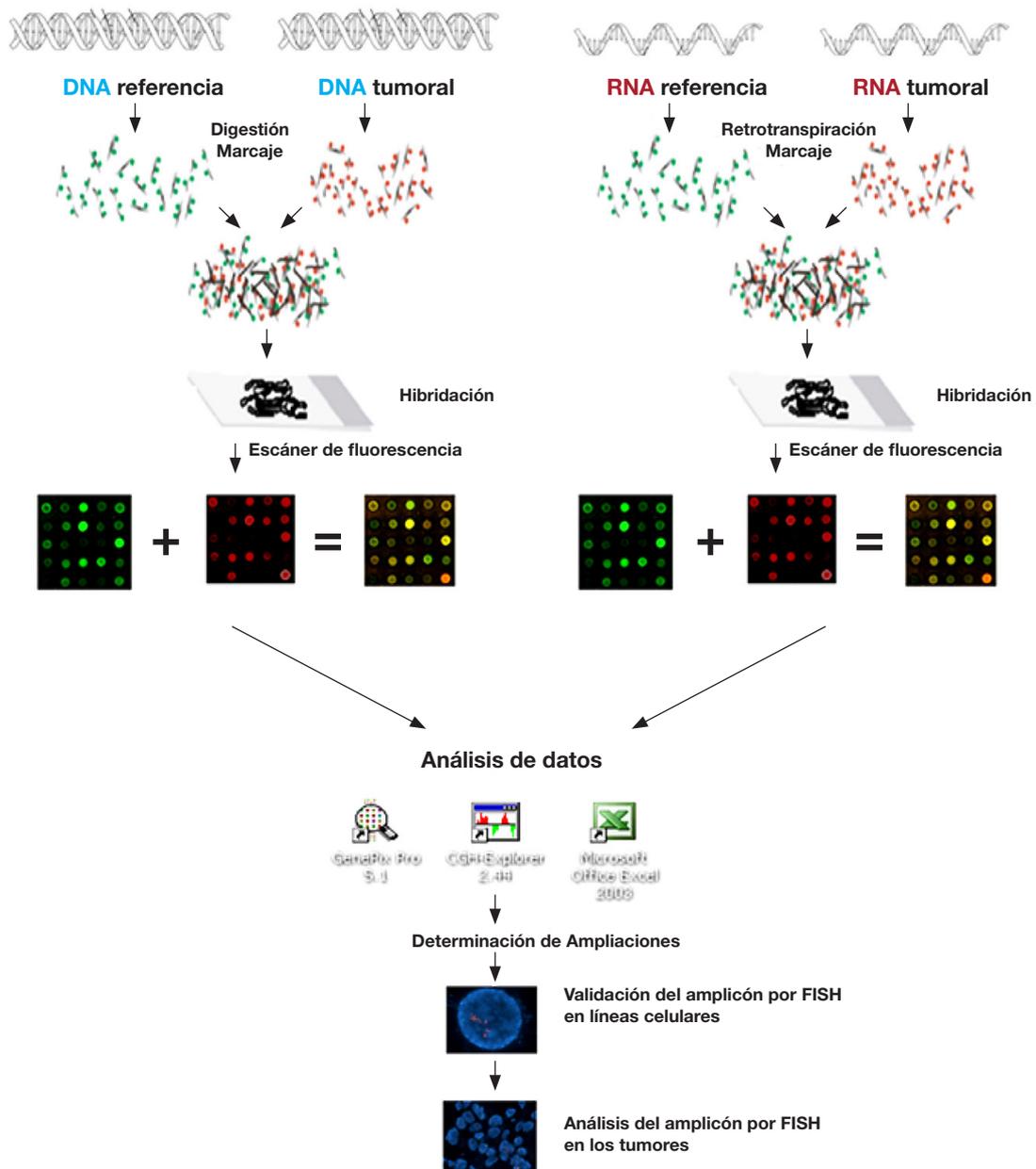


### Microarrays de hibridación genómica comparativa (CGH)

Los microarrays de CGH se utilizan para comparar masivamente secuencias concretas de ADN de posición genómica conocida de muestras diferentes. La plataforma de estos microarrays puede ser igual a los de expresión, es decir ADNc, aunque existen microarrays específicos que se están desarrollando *ex profeso* para dicha técnica y contienen secuencias de ADN. En el presente trabajo se utilizó la misma plataforma para los microarrays de expresión y CGH (OncoChip). El desarrollo experimental es similar al descrito anteriormente en los microarrays de expresión con la salvedad de que se utiliza ADN, en lugar de ARN retrotranscrito a ADNc (Figura M2).

Inicialmente, se crecieron las líneas celulares de cáncer de pulmón: Calu3, H23, A427, H441, A522, A549, H1299 y H2126 bajo las condiciones recomendadas, y se les extrajo el ADN por procedimientos convencionales. Como ADN control, se utilizó el extraído de linfocitos sanguíneos a cinco individuos sanos. Ambos tipos de ADN se fraccionaron mediante digestión con los enzimas *Alu I* y *Rsa I*. Más adelante, se purificaron y se marcaron los fragmentos con los fluorocromos Cy3 (ADN normal) y Cy5 (ADN tumoral) utilizando "Bioprime Labeling Kit (GIBCO-BRL, Grand Island, NY, USA). Los procesos posteriores de hibridación y extracción de datos son similares a los descritos anteriormente para microarrays de expresión. Como software específico se utilizó el "CGH Explorer" v2.44 (<http://www.ifi.uio.no/forskning/grupper/bioinf/Papers/CGH/>).

Figura M2: Metodología utilizada para la búsqueda de regiones amplificadas en cáncer de pulmón.



## Hibridación Fluorescente in situ (FISH)

En esta técnica se utiliza una sonda específica marcada fluorescentemente para localizar una región determinada de ADN en el genoma celular (ya sea en el núcleo interfásico o en metafase). Las aplicaciones de esta técnica son variadas, puede utilizarse tanto para localizar la posición de un determinado gen, como para caracterizar aberraciones cromosómicas de cariotipos. En el presente estudio, se utilizó para validar las amplificaciones génicas que previamente se habían hallado mediante el microarray de CGH.

### Preparación de las sondas fluorescentes específicas:

Se utilizaron dos tipos de sondas: sondas específicas situadas en el núcleo de los amplicones hallados mediante los microarrays de CGH y sondas control centoméricas, o de regiones del mismo cromosoma no amplificadas. Las sondas se elaboraron a partir de ADN específico extraído de cromosomas artificiales bacterianos (BACs) obtenidos de Invitrogen (CA, USA) o de BACPAC Resource Center (BPRC) del Children's Hospital Oakland Research (Institute in Oakland, CA, USA; **Tabla M3**). Para constituir la sonda, cuando fue posible, se utilizaron varios BACs solapantes con el fin de mejorar la eficacia y especificidad del ensayo. Cada una de las sondas BACs se validaron por separado sobre metafases de células normales comprobándose que hibridaban en la posición cromosómica indicada. Una vez purificados los BACs, tras su amplificación y extracción a partir de células de *E.coli*, se utilizó el "CGH translation KIT" (Vysis. Inc., Downers Grove, IL, USA) para marcar 10µg de cada sonda. El marcaje para las sondas control fue en verde (con dUTP-Cy3) y las sondas del amplicón se marcaron en rojo (con dUTP-Cy5), siguiendo las indicaciones del proveedor. Posteriormente se purifi-

**Tabla M3:** Cromosomas artificiales bacterianos utilizados para construir sondas fluorescentes específicas.

BAC	GENES	POSICIÓN
CTD-3092E20	NUP155, WDR70	5p13.2
RP11-52A1	CPNE5, PPIL1	6P21.1
RP11-170N22	CPNE5, PPIL1	6P21.1
RP11-58G14	PPIL1, PH16, FGD2	6P21.1
RP4-625H18	ID4	6P22.3
RP11-715F10	AIP, CDK2AP2, GSTP1, CABP2	11q13.2
CTD-2530J15	CLCF1, RAD9, PPP1CA, RPS6KB2, PTPPRCAP, CORO1B, CABP4, AIP, CDK2AP2, GSTP1, CABP2	11q13.2
RP11-65L1	FCHSD2	11q13.4
RP11-800A3	P2RY2, P2RY6, ARHGEF17	11q13.4
RP11-933G1	P2RY2, P2RY6, ARHGEF17, TNFRSF19C, D87470	11q13.4
RP11-123C1	RUVBL2, LHB, CAGB, CGB1, CGB2, CGB5, CGB8, CGB2, CGB7, NTF5, KCNA7, SNRP70, LIN7B, PPFIA3, HRC, TRPM4	19q13.3
RP11-591H17	RUVBL2, LHB, CAGB, CGB1, CGB2, CGB5, CGB8, CGB2, CGB7, NTF5, KCNA7, SNRP70, LIN7B, PPFIA3, HRC, TRPM4	19q13.3
<b>SONDAS DE CONTROL</b>		
	RP11-20606	19p11-19p11
	RP11-277K21	6q12
	RP11-12C1	11q11.2
	RP11-91I22	5q11.2

có el ADN, se añadió 20µg de bloqueante Human Cot 1 ADN (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y precipitó el ADN. Finalmente se resuspendió en tampón de hibridación LSI/WCP " (Vysis. Inc., Downers Grove, IL, USA).

## Hibridación

La hibridación se realizó sobre un portaobjetos, donde se habían depositado núcleos de las líneas celulares estudiadas, o en el caso de tumores, sobre microarrays de tejidos (TMA, del inglés Tissue Microarray). Los portaobjetos, se deshidrataron con etanol y sobre ellos se depositó una mezcla que contenía: 1.5µl de la sonda del amplicón (marcada en rojo), 1.5µl de la sonda control (marcada en verde) y 7µl tampón de hibridación LSI/WCP (Vysis. Inc., Downers Grove, IL, USA). Posteriormente el ADN se desnaturalizó a 72°C durante 2 minutos, y se incubó 16h a 37°C en una cámara húmeda. Finalmente, se lavó el portaobjetos y se tiñó con DAPI para su visualización en un microscopio de fluorescencia.

### Creación de matrices titulares (tissue microarray, TMA).

La hibridación fluorescente *in situ* sobre los tumores primarios se realizó sobre una matriz tisular que contenía secciones de tejidos tumorales seleccionados de diferentes pacientes de cáncer de pulmón (tissue microarray, TMA).

Los TMA facilitan un análisis masivo de diferentes tejidos pulmonares mediante diversas técnicas entre las que se incluyen las de inmunohistoquímica o, como en este caso, de hibridación fluorescente *in situ*.

La construcción de los TMA (**Figura M5**), puede resumirse en los siguientes apartados:

- Selección del material:** selección de las preparaciones histológicas y bloques de parafina que continen embebidos los tumores pulmonares de interés.
- Selección de la zona a pinchar** dentro del bloque donante.
- Diseño de la plantilla del TMA**, mediante un programa informático, en la cual existe una serie de duplicados y de controles como control de calidad del ensayo.
- Realización del bloque receptor:** pinchando sucesivamente los bloques donantes en las zonas previamente seleccionadas, guiándonos por el diseño predefinido de la plantilla, para posteriormente introducir los cilindros en el bloque receptor, que poco a poco se convierte en una matriz que contiene secciones tumorales representativas de una muestra de pacientes con cáncer de pulmón.

### PCR cuantitativa (qPCR).

En el presente estudio se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) sobre ADN y sobre ARN con el fin de corroborar los datos obtenidos en los

microarrays de CGH y de expresión respectivamente. El ADN se extrajo de las líneas celulares y de los tumores primarios, utilizando el DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) siguiendo el protocolo del proveedor. De forma similar, el ARN se extrajo de las líneas celulares usando "RNeasy kit" (Qiagen Inc., Valencia, CA). Los tumores, sin embargo, se trataron con Trizol (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY, USA) antes de usar el RNeasy kit. Durante el proceso se usó la nucleasa "RNase-free DNase I" (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) para eliminar posibles interferencias con el ADN. Para comprobar que el ARN no había sufrido degradación durante el proceso de extracción se realizó una electroforesis con 1 µg del ARN obtenido.

La reacción de retrotranscripción (RT) se realizó a partir de 1 µg de ARN utilizando el kit "Reverse Transcription System" (Promega, WI, USA) basado en las propiedades del enzima AMV-retrotranscriptasa. Para estas reacciones se utilizaron como cebadores hexámeros aleatorios (en tumores primarios) y oligo-dT (en líneas celulares).

Las reacciones de qPCR se realizaron a partir de 25ng de producto total utilizando "The SYBR® Green PCR Master Mix" (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) y cebadores específicos para los genes. Las condiciones de PCR fueron: 2 min a 50°C, 10 min a 95 °C y 40 ciclos de amplificación (95°C durante 15 segundos y 60°C durante 30 segundos). La proteína gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) se utilizó para normalizar las variaciones de las cantidades del ADNc de partida.

La evolución de la PCR se siguió con un sistema detector de secuencias ABI Prism 7700. Una vez obtenidas las curvas de amplificación la cuantificación se realizó siguiendo una curva estandar de amplificación o mediante el método  $\Delta C_t$ .

## Resultados

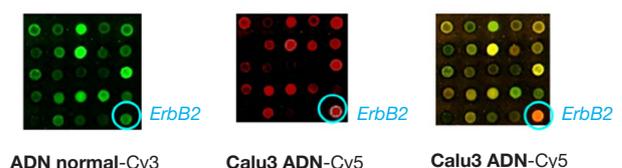
La amplificación génica es uno de los mecanismos de activación de proto-oncogenes en los tumores. De entre los genes comúnmente amplificados en cáncer se encuentran *myc* y *ErbB2*, cuyo incremento en el número de copias en el ADN se asocia a elevados niveles de expresión génica y constituye un mecanismo de activación oncogénica de varios tipos de cáncer. Los microarrays de CGH (Comparative Genome Hybridization), que permiten el análisis global y cuantitativo del número de copias de un genoma, pueden utilizarse como herramientas para determinar con gran resolución los cambios que se producen en la dotación génica de una línea celular tumoral al compararla con un ADN genómico control. Distintos trabajos han demostrado la viabilidad de utilizar plataformas de microarrays de ADNc convencionales para estudiar las alteraciones en el número de copias del ADN genómico en células tumorales. Por ello, otro de

los objetivos del presente trabajo fue la identificación de nuevas regiones amplificadas en líneas celulares de tumores pulmonares que alberguen oncogenes potencialmente relevantes para el desarrollo de este tipo de cáncer. Para identificar regiones amplificadas se estudiaron las ocho líneas celulares de cáncer de pulmón: Calu3, H23, A427, H441, H522, A549, H1299 y H2126. Tanto el análisis de las alteraciones en el número de copias del ADN genómico como los cambios en los perfiles de expresión se llevaron a cabo utilizando como plataformas los microarrays de ADNc (Oncochip).

Para el análisis del número de copias del genoma, el ADN de las líneas celulares se hibridó competitivamente contra el ADN extraído de sangre periférica de individuos normales. Por otra parte, para el análisis de expresión global el ARN total de las líneas celulares se comparó un ARN de referencia (Universal Human Reference ARN, Stratagene). Debido a que la aplicación de la técnica de microarrays de CGH a la búsqueda de amplificaciones es relativamente reciente (Pollack, Perou et al. 1999) se decidió validar su eficacia incluyendo en el análisis una línea celular que presentaba un amplicón bien caracterizado en el brazo largo del cromosoma 17 (17q12-13), que probablemente tiene como diana el oncogén *ErbB2*. La amplificación del proto-oncogén *ErbB2* se describió por primera vez en la línea celular Calu-3 a finales de los ochenta (Fukumoto, Shevrin et al. 1988). Estudios más recientes han estimado la media de copias por célula de *ErbB2* en 30, pudiendo llegar hasta 64 copias/célula; (Bunn, Helfrich et al. 2001). Los resultados globales obtenidos en relación al número de copias del ADN genómico mostraron de forma inequívoca la presencia de un incremento del número de copias del oncogén *ErbB2* (Figura R1) y genes adyacentes de la posición cromosómica 17q12 en la línea celular Calu-3 (Figura R2 y R3).

En este estudio, la amplificación de *ErbB2* fue exclusiva de la línea celular Calu3 y no se encontró en las restantes líneas celulares (Figura R2). El análisis permitió determinar que el amplicón comprende aproximadamente 5Mb (concretamente la región que va desde 31,9Mb a 36,9Mb). Dicha región contiene 140 genes según la información actual que existe sobre el mapa genómico.

**Figura R1:** Detalle de los resultados de la hibridación competitiva entre el ADN de individuos normales y el de la línea Calu3. El punto señalado corresponde al gen *ErbB2*.



**Figura R2:** Tabla de los valores obtenidos a partir de los microarrays de CGH para el amplicón 17q12 en las ocho líneas celulares analizadas. Datos expresados en Log<sub>2</sub> (Medianas Cy5/Cy3). Resaltado en verde oscuro los valores >1 y en verde claro los 0.5-1. En azul, se presentan de igual forma los valores de microarrays de ADNc de la línea Calu3.

Gen	CloneID	Mb	Calu3	H23	A427	H441	h522	A549	H1299	H2126	Calu3
CCL18	IMAGE:768497	31.416	-0.035	-0.034	0.199	0.25	0.895	0.177	-0.207	0.094	0.188
CCL3	IMAGE:460398	31.440	-0.253	0.17	-0.048	0.33	0.397	0.055	-0.261	0.09	-0.391
CCL3L1	IMAGE:153355	31.635	-0.322	-0.145	-0.043	0.263	0.202	0.06	-0.459	-0.137	-0.104
TRIP3	IMAGE:66787	31.917	0.318	0.025	0.327	0.311	0.952	0.3	-0.218	0.224	0.134
MGC4172	IMAGE:782783	32.022	1.114	0.12	0.282	0.381	0.582	0.374	0.012	0.254	0.596
AATF	IMAGE:2072912	32.380	1.006	-0.112	0.397	0.143	0.567	0.163	-0.066	-0.04	0.785
AP1GBP1	IMAGE:362829	32.952	1.176	-0.221	0.024	0.013	0.671	0.037	-0.208	-0.074	0.806
RNF110	IMAGE:809916	34.144	1.402	0.05	0.367	0.338	0.887	0.312	-0.064	0.191	1.463
PSMB3	IMAGE:951233	34.163	1.021	-0.12	0.364	0.032	0.254	0.168	-0.018	0.159	1.878
FBXL20	IMAGE:1185229	34.670	2.788	-0.148	1.311	0.804		-0.907	-0.944	-0.57	1.234
PPP1R1B	IMAGE:277173	35.037	4.971	0.095	0.444	0.531	0.836	0.269	-0.197	0.334	0.669
ERBB2	IMAGE:783729	35.110	3.122	-0.058	0.045	-0.065	0.113	0.005	0.053	-0.069	4.56
GRB7	IMAGE:236059	35.148	3.912	0.381	0.677	0.326		0.489	0.079	0.31	5.027
GSDML	IMAGE:244062	35.314	5.488	-0.598	0.298		0.432	0.322	-0.122	0.104	4.902
ORMDL3	IMAGE:767775	35.331	3.661	-0.124	0.199		0.554	-0.165	0.183	0.108	4.117
PSMD3	IMAGE:815861	35.391	2.907	0.362	0.656		1.02	0.421	0.314	0.777	2.584
CSF3	IMAGE:1667001	35.425	3.343	0.148	0.339	0.348	0.985	0.417	0.065	0.256	0.267
THRA	IMAGE:22074	35.473	2.183	0.138	0.248	0.371	0.967	0.28	0.102	0.224	1.967
CDC6	IMAGE:204214	35.698	1.231	-0.308	-0.085	-0.166	0.025	-0.231	-0.366	-0.221	0.929
RARA	IMAGE:461516	35.719	1.478	0.084	0.202	0.178	1.561	0.185	-0.02	0.082	2.435
TOP2A	IMAGE:825470	35.798	2.281	-0.145	-0.053	-0.18	0.344	0.196	-0.529	-0.131	0.751
CCR7	IMAGE:3053351	35.964	2.926	0.105	0.284	0.403	1.079	0.294	0	0.347	0.346
KRT20	IMAGE:586796	36.286	1.408	-0.13	0.309	0.177	0.911	0.244	-0.198	0.185	
KRT13	IMAGE:327676	36.911	0.237	-0.273	-0.061	-0.174	-0.131	-0.096	-0.438	-0.104	0.924
KRT19	IMAGE:810131	36.933	0.629	0.246	0.295	0.373	0.335	0.322	0.06	0.199	4.016
KRT14	IMAGE:183602	36.992	0.369	-0.126	0.059	0.251	0.065	0.332	0.138	0.045	3.238
NKIRAS2	IMAGE:137971	37.423	0.178	-0.138	0.008	-0.11	0.024	0.043	-0.236	-0.026	1.034
RAB5C	IMAGE:745249	37.531	0.521	0.025	0.429	0.578	0.912	0.607	0.16	0.112	0.865
LGP1	IMAGE:1555536	37.595	0.35	0.001	0.305	0.225	0.405	0.076	-0.089	0.131	1.104
STAT5A	IMAGE:115638	37.694	0.575	-0.277	-0.026	-0.18	0.721	0.067	-0.311	-0.184	-0.956
STAT3	IMAGE:1469311	37.719	0.695	-0.008	0.245	0.339	1.033	0.44	-0.139	0.205	0.329
STAT3	IMAGE:725746	37.719	0.494	-0.104	0.475		0.624	0.336	-0.293	0.17	0.126
ATP6V0A1	IMAGE:770377	37.864	0.149	-0.085	0.288	0.029	0.301	0.079	-0.177	-0.02	0.611
TCFL4	IMAGE:114410	37.973	0.444	0.168	0.205	0.157	0.682	0.583	-0.106	0.224	0.522
TCFL4	IMAGE:502582	37.973	0.147	-0.012	0.082	0.036	0.277	0.118	-0.207	0.044	-0.005
TUBG1	IMAGE:108377	38.015	0.557	0.164	0.581	0.183	0.67	0.29	-0.078	0.072	-0.041

En la **figura R3** se muestra una representación del número de copias del ADN junto los niveles correspondientes de expresión de los genes incluidos en el Oncochip para todo el cromosoma 17 en la línea Calu3. Es importante destacar la correlación existente entre amplificación génica y la sobreexpresión de la mayoría de los genes contenidos en la región (**Figura R2 y R3**), hecho que no sucede en todos los amplicones. La amplificación de 17q12 se corroboró con la técnica de FISH (hibridación fluorescente *in situ*), utilizando para ello una sonda de *ErbB2* (marcada en rojo) sobre el ADN total (teñido en azul con DAPI) de la línea Calu3 (**Figura R4**). Como control se utilizó una sonda centromérica marcada en verde que detectó la presencia de tres cromosomas que portaban el centrómeros del cromosoma 17. En los núcleos interfásicos se observó un número de copias para el gen *ErbB2* superior a 25. En los núcleos metafásicos se observaba un cromosoma 17 con una morfología típica (submetacéntrica) y dosis génica de *ErbB2* normal (situado en el centro derecha, **Figura R4**) y dos cromosomas telocéntricos aberrantes que presentan amplificación génica de *ErbB2*.

Una vez validado el sistema y, en base a los parámetros proporcionados por el control, se analizó la presencia

de amplicones en el resto de las líneas celulares, utilizando los siguientes criterios de selección: a) regiones que contengan genes cuyo valor Log<sub>2</sub> (Medianas Cy5/Cy3) fuera mayor a 1 y b) incremento del Log<sub>2</sub> (Medianas Cy5/Cy3) superior a 0,5 en al menos cuatro genes adyacentes al anterior. Aplicando estos criterios se seleccionaron las siguientes regiones cromosómicas: 5p13 en la línea H23; 6p21 y 6p23 en la línea H522; 11q13.2 en las líneas H23 y H441 y 11q13.4 en las líneas H23, A427 y H441 y, finalmente, 19q13 en la línea H2126. En la figura R5 se representan los valores de CGH referentes a todo el genoma de algunas de las líneas celulares estudiadas.

### Análisis de la región amplificada en el cromosoma 5p13.

El amplicón 5p13 fue identificado en la línea celular H23 y abarca aproximadamente 7Mb (desde la posición 34 a la 41Mb; **Figura R6**). Dicha región contiene alrededor de 50 genes según el mapa actual del genoma humano. Los datos aportados por los microarrays de expresión, mostraron que esta amplificación génica no se traducían en un claro aumento de expresión génica, al menos para aquellos genes contenidos en el Oncochip. Es posible que valores relativos de sobreexpresión de menor magnitud o que alguno de los genes no incluidos en el Oncochip

Figura R3: Datos de CGH y ADNc microarrays del cromosoma 17 de la línea celular Calu3 (expresados en Log2 Medianas Cy5/Cy3).

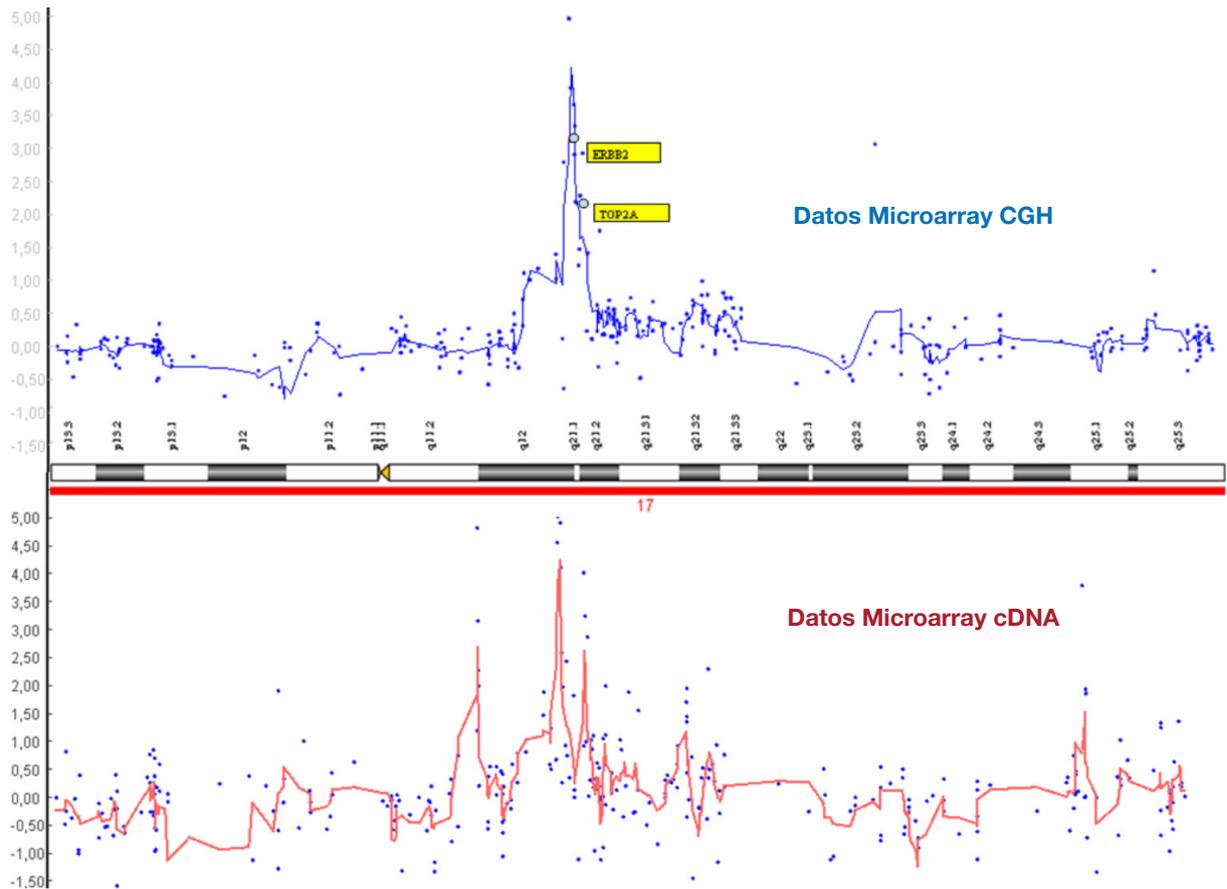


Figura R4: Hibridación fluorescente in situ utilizando una sonda contra *ErbB2* (rojo) y una sonda centromérica (verde).

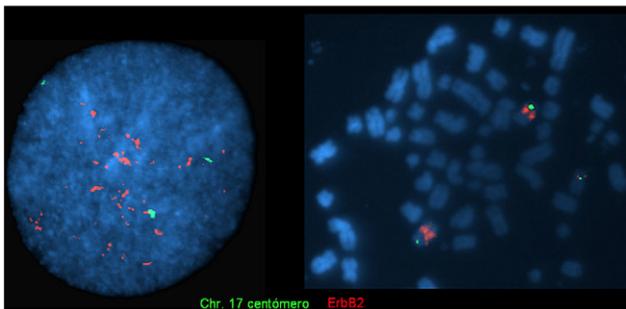
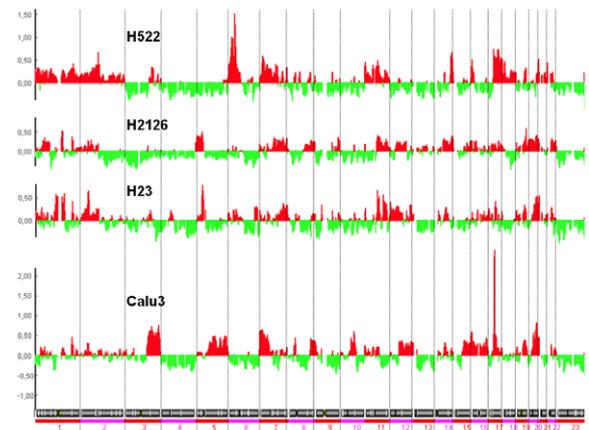


Figura R5: Valores de CGH en el genoma de las líneas celulares H522, H23, H2126 y Calu3. Datos expresados en Log2 (Medianas Cy5/Cy3) ajustadas.



sean responsables de dicha amplificación génica. Alternativamente cabe la posibilidad de que no existan ningún oncogén diana en esta región y que se trate de un fenómeno de reordenamiento genético recurrente debido a la elevada inestabilidad genética de estos tumores.

Para la validación por FISH se marcó en rojo un BAC situado en el núcleo del amplicón (CTD-3092E20) que contenía los genes *NUP155* y *WDR70*. Como región control se marcó en verde el BAC (RP11-91122) situado en la región distante situada cerca del centrómero (5q11.2). En el análisis de FISH se observó una cons-

picua amplificación de la región 5p13 en la línea H23 (Figura R7). Para su comparación se muestra la línea H522, que se hibridó en paralelo con la H23 y presenta dosis génicas normales.

Al ser uno de los amplicones más recurrentes en tumores primarios (como veremos más adelante), fue elegido para estudiar más extensivamente.

Figura R6: Valores de CGH en el cromosoma 5 de la línea celular H23.

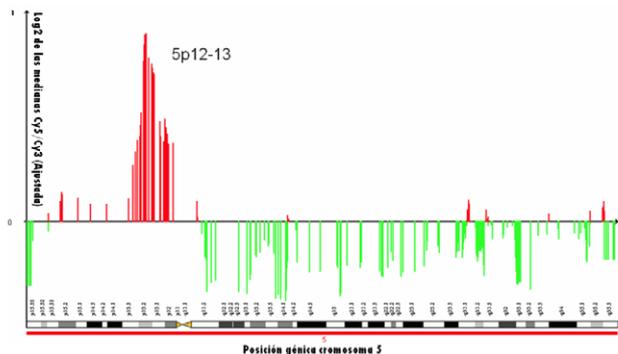


Figura R7: Hibridación fluorescente in-situ sobre la región 5q12 (rojo) y el centrómero del cromosoma 5 (verde). La línea H522 (A-B) muestra una dosis génica normal y la H23 (C-D) una clara amplificación.

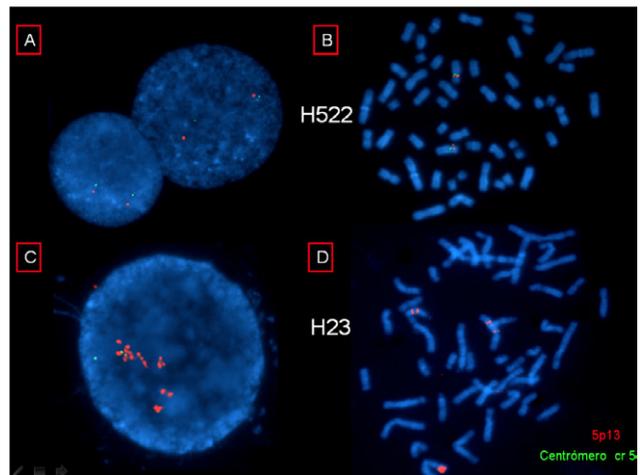


Figura R8: Tabla de los valores obtenidos a partir de los microarrays de CGH para los amplicones 6p21 y 6p22 en las ocho líneas celulares analizadas. Datos expresados en Log2 (Medianas Cy5/Cy3). Resaltado en verde oscuro los valores >1 y en verde claro los 0.5-1. En azul, se presentan de igual forma los valores de microarrays de ADNc de la línea Calu3.

Gen	CloneID	Mb	Calu3	H23	A427	H441	H522	A549	H1299	H2126	H522 cDNA	
HIVEP1	IMAGE:75803	12.121	-0.26	0.12	0.05	0.18	0.28	-0.17	0.78	-0.05	-0.11	6p22-24
DTNBP1	IMAGE:105558	15.631	0.12	0.16	0.13	0.21	0.93	0.07	0.19	0.11	1.116	
FAM8A1	IMAGE:231223	17.709	-2.01	-0.34	-0.74	-0.87	2.31	-0.88	0.12	-2.44	1.41	
DEK	IMAGE:46213	18.332	-0.07	0.12	-0.2	0.03	2.1	-0.1	0.22	-0.05	0.568	
ID4	IMAGE:78823	19.946	-0.21	0.09	-0.23		1.41	-0.26	-0.06	0.09	3.102	
ALDH5A1	IMAGE:44505	24.603	-0.12	0	-0.19	0.02	0.93	-0.16	0.15	-0.15	1.075	
TTRAP	IMAGE:84325	24.758	0.08	0.14	-0.33	0.12	1.39	-0.34	0.35	-0.05	1.701	
HIST1H4B	IMAGE:184217	26.135	-0.4	0.09	-0.28	-0.09	0.26	-0.38	0.27	-0.35	0.595	
HIST1H4C	IMAGE:146113	26.135	-0.07	0.09	-0.26	0.42	0.25	-0.14	0.92	-0.19	0.679	
HIST1H4H	IMAGE:447715	26.135	-0.15	0.04	-0.08	0.2	0.1	-0.36	0.31	-0.2	0.859	
HIST1H4J	IMAGE:23083	26.135	-0.28	0.08	-0.3	-0.1	0.17	-0.36	0.45	-0.27	0.819	
HIST1H1C	IMAGE:66317	26.164	-0.7	0.03	-0.41	-0.09	-0.01	-0.26	-0.03	-0.07	0.133	
BAK1	IMAGE:235938	33.648	0.24	0.12	0.37	0.53	0.24	0.08	0.29	0.31	0.715	6p21
RPS10	IMAGE:2252417	34.493	-0.23	-0.43	-0.27	-0.2	-0.23	-0.22	-0.12	-0.31	0.092	
ZNF76	IMAGE:745003	35.335	0.01	0.48	0.03	0.39	2.93	0.2	0.36	0.35	1.472	
PPARD	IMAGE:270626	35.418	-0.06	0.23	0.12	0.29	0.7	-0.05	0.14	-0.07	1.206	
RPL10A	IMAGE:124824	35.544	-0.09	0.09	-0.13	-0.18	0.53	-0.09	0	-0.24	-0.3	
MAPK14	IMAGE:772261	36.104		-0.11	-0.66	-3.17	1.62	-0.95	0.11	-1.29	1.396	
MAPK13	IMAGE:590774	36.130	-0.08	0.06	-0.04	0.31	1.28	-0.02	-0.05	-0.23	-1.601	
C6orf69	IMAGE:227338	36.519	-0.48	-0.23	-0.37	-0.07	1.22	-0.54	-0.13	-0.37	0.16	
C6orf69	IMAGE:43828	36.519	-0.04	0.01	-0.2	0.13	1.32	-0.14	0.18	-0.06	-0.286	
STK38	IMAGE:826135	36.570	-0.39	-0.09	-0.03	-0.11	1	-0.1	-0.16	-0.23	1.092	
SFRS3	IMAGE:950092	36.670	-0.13	-0.24	-0.51	-0.42	1.73	-0.31	0.13	-0.28	0.282	
CDKN1A	IMAGE:133504	36.754	-0.11	0.32	0.04	0.42	1.32	0.03	0.38	0.13	0.099	
PPIL1	IMAGE:431796	36.931	-0.4	-0.17	-0.41	-0.24	2.13	-0.18	-0.32	-0.34	1.186	
PIM1	IMAGE:292726	37.246	-0.71	0.16	-0.34	0.06	1.76	-0.4	0.24	-0.37	0.048	
PIM1	IMAGE:813630	37.246	-0.32	0.23	0.24	0.84	1.87	-0.19	0.26	-0.14	-0.16	
C6orf128	IMAGE:1641726	37.288	-0.38	0.19	-0.23	0.08	1.48	-0.14	0.23	-0.07	0.572	
MDGA1	IMAGE:262763	37.708	-0.21	0.24	-0.26	0.15	1.67	-0.08	0.03	-0.09		
GLO1	IMAGE:491001	38.752	-0.37	0.1	-0.28	0.05	1.53	-0.09	-0.03	-0.23	1.694	
DNAH8	IMAGE:435871	38.791	-0.33	-0.01	-0.46	0.14	1.37	-0.21	0.1	-0.15	0.459	
C6orf102	IMAGE:1850834	39.412	0.01	0.15	-0.23	0.27	1.35	-0.1	0.16	0.05	-0.156	
TBN	IMAGE:1590007	42.126	0.01	0.2	0.16	0.26	0.24	0.13	0.2	0.24	0.372	
C6orf133	IMAGE:281904	42.640	-0.38	-0.21	-0.17	-0.34	-0.01	-0.42	0.24	-0.61	-0.139	

### Análisis de la región amplificada en el cromosoma 6p21 y 6p23.

Los amplicones 6p21 y 6p23 fueron identificados simultáneamente en la línea celular H522. La amplificación para la región 6p21 abarca aproximadamente 7,8Mb (desde la posición 34,4 a 42,2Mb) y contiene alrededor de 100 genes conocidos, según el mapa actual del genoma humano. Por otra parte, el amplicón 6p23 abarca aproximadamente 10Mb (desde la posición 16,2- a 26,2Mb) y contienen alrededor de 60 genes conocidos. Ambas amplificaciones están separadas por un valle de unos 7,8Mb (**Figura R9**). La cercanía de ambos amplicones y la presencia de ambos en la misma línea celular sugieren que se trata de un fenómeno de reordenamiento complejo. Los datos aportados por los microarrays de expresión, mostraron que sólo el amplicón 6p23 presentaba un aumento significativo en la expresión de los genes amplificados (**Figura R8**).

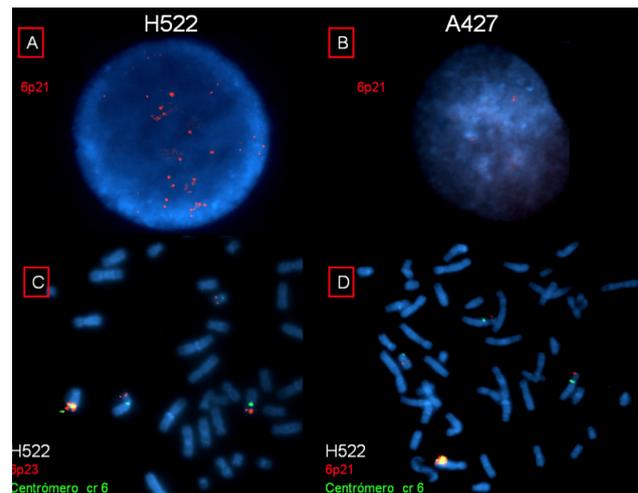
De forma similar a los anteriores amplicones, la amplificación en el cromosoma 6 se confirmó mediante la técnica de FISH. Para 6p21 se marcó en rojo una serie de BACs situados en el núcleo del amplicón (RP11-170N22 y RP11-58G14) que contenían los genes *CPNE5*, *PPIL1*, *PI16* y *FGD2*. Para el amplicón 6p23 se marcó en rojo un BACs situado en el núcleo del amplicón (RP4-625H18) que contenía el gen *ID4*. Como control se utilizó una sonda centromérica marcada en verde (Chromosome 6 Satellite Probe, Driect Green, Qbiogene, UK). Las imágenes captadas tras la FISH mostraron una clara amplificación en un núcleo interfásico de la línea H522 en la región 6p21 (**Figura R10-A**), mientras que la FISH realizada en paralelo con la misma sonda en un núcleo de la línea A427 mostró una dosis génica normal (**Figura R10- B**).

En las metafases (**Figura R10-C**), se observaron cuatro cromosomas con el centrómero del cromosoma 6, dos de ellos presentan una morfología normal (submetacéntrica), mientras que los otros dos son aberrantes. Uno de los cromosomas aberrantes presenta un número elevado de copias de la región 6p21 que, además, incluyen el centrómero, tal y como indica la señal amarilla de superposición. La comparación de metafases de la

línea H522 para los amplicones de las regiones 6p21 y 6p23 (**Figura R10-C** y **R10-D**, respectivamente) muestra los mismos cromosomas implicados en las regiones amplificadas.

Al ser uno de los amplicones más recurrentes en tumores primarios (como veremos más adelante), fue elegido para estudiar más extensivamente.

**Figura R10:** Arriba: Hibridación fluorescente *in-situ* sobre la región 6p21 (rojo). La línea A427 muestra una dosis génica normal y la H522 una conspicua amplificación. Abajo: Hibridación fluorescente *in-situ* sobre el amplicón 6p21 y 6p23 (rojo) y el centrómero del cromosoma 6 (verde) en la línea H522.

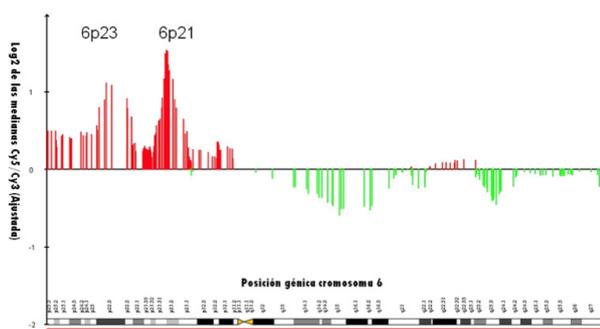


### Análisis de la región amplificada en el cromosoma 11q.

Los amplicones de 11q13.2 y 11q13.4 fueron identificados simultáneamente en las líneas celulares H23 y H441. Ambos tienen una longitud aproximada de 2Mb, abarcando las posiciones desde 66,4 a 68,4Mb para 11q13.2 y desde 71,4 a 73,4 para 11q13.4. Según los datos obtenidos por el estudio de microarrays de CGH, ambos amplicones están separados por una región de aproximadamente 3Mb (Figura R11). De la misma forma que se observaba para la amplificación en el cromosoma 6, la cercanía de ambos amplicones y la presencia de ambos en las mismas líneas celulares sugiere que se trata de fenómenos de reordenamiento complejo. Ambas amplificaciones se asocian con un aumento de los niveles transcripcionales, especialmente la amplificación de 11q13.2 en la línea H23 (Figura R13).

De forma similar a los anteriores amplicones, la amplificación en el cromosoma 11 se confirmó mediante la técnica de FISH. Para la región 11q32.2 se marcó en rojo una serie de BACs situados en el núcleo del amplicón (RP11-715F10 y CTD-2530J15) que contenían los genes *CLCF1*, *RAD9*, *PPP1CA*, *RPS6KB2*, *PTPPRCAP*, *CO-RO1B*, *CABP4*, *AIP*, *CDK2AP2*, *GSTP1* y *CABP2*. Para el amplicón 11q32.4 se marcó en rojo un BACs situado en el núcleo del amplicón (RP11-65L1, RP11-800A3 y RP11-933G1) que contenía los genes *FCHSD2*, *P2RY2*,

**Figura R9:** Valores de CGH para el cromosoma 6 de la línea celular H522.



*P2RY6*, *ARHGEF17* y *TNFRSF19C*. Como región control se marcó en verde un BAC (RP11- 12C1) situado en la región cercana al centrómero (11p11.2). La compara-

ción de metafases de la línea H441 para los amplicones de las regiones 11q13.2 y 11q13.4 (Figura R12) muestran los mismos cromosomas implicados en las regiones amplificadas. Los núcleos en metafase muestran la presencia de dos copias del cromosoma 11 normales (metacéntricos) junto con un cromosoma aberrante que contiene varias copias de la región 11q13.2 y 11q13.4.

Figura R11: Valores de CGH para el cromosoma 11 de las líneas celulares H23 y H441.

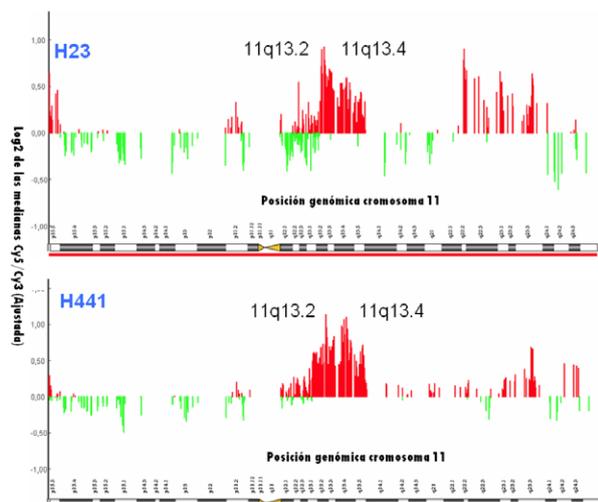


Figura R12: Hibridación fluorescente in situ de los amplicones 11q13.2 y 11q13.4 en la línea H441.

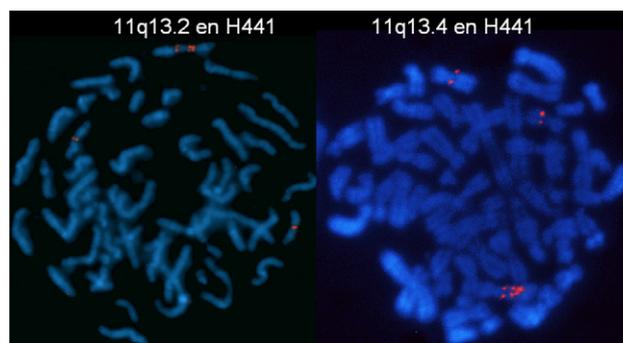


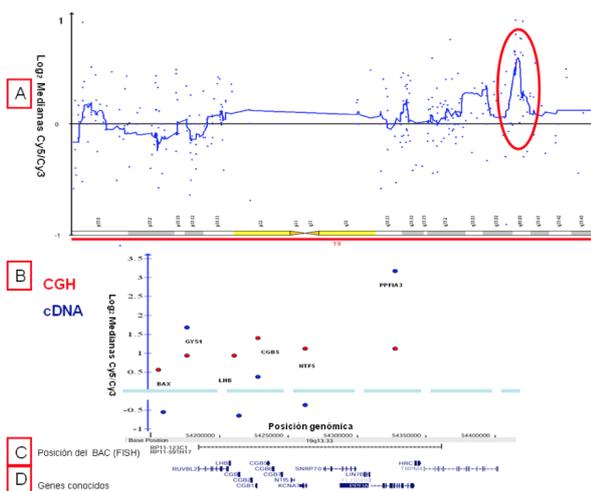
Figura R13: Tabla de los valores obtenidos a partir de los microarrays de CGH en las ocho líneas celulares analizadas para los amplicones 11q13.2 y 11q13.4. Datos expresados en Log2 (Medianas Cy5/Cy3). Resaltado en verde oscuro los valores mayores a 1 y en verde claro los valores entre 0.5 y 1. En azul, se presentan de igual forma los valores de microarrays de ADNc de las líneas H23 y H441 respectivamente.

Gen	CloneID	Mb	Calu3	H23	A427	H441	H522	A549	H1299	H2126	H23 cDNA	H441 cDNA
RBM30	IMAGE:247216	66.189	-0.086	-0.47	0.076	0.71	-0.151	-0.025	-0.069	0.262	-0.778	-0.036
RCE1	IMAGE:2009655	66.367	0.162	0.178	0.252	0.628	0.372	0.229	0.095	0.331	1.236	0.935
SYT12	IMAGE:51284	66.531	0.165	0.188	0.427	0.62	0.502	0.158	0.083	0.356	0.492	2.896
RHOD	IMAGE:591907	66.581	0.225	0.583	0.621	0.981	0.396	0.267	0.088	0.398	1.491	0.414
POLD4	IMAGE:810734	66.876	0.011	0.87	0.38	0.948	-0.566	0.269	0.147	0.587	1.629	1.358
CLC	IMAGE:1664309	66.888	0.005	0.555	0.297	0.398	0.242	0.157	0.024	0.205	1.618	1.524
PPP1CA	IMAGE:196102	66.922	0.054	0.707	0.466	0.653	0.272	0.247	0.114	0.293	1.938	0.929
RPS6KB2	IMAGE:324712	66.953	0.189	0.707	0.425	0.577	0.315	0.269	0.195	0.399	2.509	0.712
AIP	IMAGE:814731	67.007	0.636	1.288	0.534	1.532	1.718	0.531	0.498	0.813	1.727	0.887
PITPNM1	IMAGE:277186	67.016	0.195	0.963	0.486	0.863	0.388	0.2	0.145	0.397	1.429	
DOC-1R	IMAGE:810429	67.031	-0.167	0.142	0.369	0.2	0.014	-0.01	0.038	-0.054	1.693	0.929
NDUFV1	IMAGE:770043	67.131	0.133	0.356	0.165	0.466	0.17	-0.048	-0.092	0.25	1.329	0.325
NDUFV1	IMAGE:825302	67.131	0.065	0.324	0.207	0.098	0.142	0.298	0.168	0.3	1.429	-0.898
ALDH3B2	IMAGE:771308	67.186	0.285	1.204	0.456	1.259	0.489	0.366	0.255	0.542	1.19	1.331
NDUFS8	IMAGE:502141	67.555	0.011	0.288	0.052	0.208	0.042	-0.108	-0.107	0.022	1.359	0.816
TCIRG1	IMAGE:2015083	67.563	0.046	0.295	0.154	0.289	0.113	0.08	-0.062	0.005	0.801	0.73
CHKA	IMAGE:462632	67.577	0.205	1.077	0.188	1.071	0.319	-0.123	-0.502	0.555	0.006	-0.274
CHKA	IMAGE:46367	67.577	0.298	0.757	0.409	0.734	0.244	0.048	-0.034	0.261	0.189	0.437
SUV420H1	IMAGE:782832	67.680	-0.33	0.66	-0.137	0.569		-0.254	-0.513	0.339	0.702	0.787
SUV420H1	IMAGE:826099	67.680	0.015	0.922	0.265	0.913	0.598	-0.203	-0.15	0.382	0.798	0.719
LRP5	IMAGE:194451	67.837	0.584	0.687	0.497	2.356	1.037	0.602	0.927	0.188	0.25	2.452
C11orf23	IMAGE:128785	67.985	0.13	0.806	0.534	0.683	-0.543	-0.155	-0.343	0.209	-0.281	-1
C11orf23	IMAGE:293830	67.985	-0.023	0.383	0.576	0.213	-0.005	-0.192	-0.283	-0.023	0.817	0.475
DKFZP564M082	IMAGE:771317	71.499	0.005	-0.037	0.318	0.178	-0.097	-0.137	-0.202	-0.181	0.727	-0.16
FOLR3	IMAGE:324715	71.524	0.186	0.57	0.7	0.975	0.3	0.211	0.061	0.444	-1.556	0.083
FOLR1	IMAGE:131839	71.578	0.09	0.388	0.716	0.741	0.232	0.124	0.025	0.279	-3.913	-0.146
FOLR2	IMAGE:813757	71.605	0.226	0.631	0.868	1.093	0.473	0.253	0.001	0.513	-0.518	0.033
SKD3	IMAGE:565653	71.681	0.422	0.889	1.512	1.525	1.377	0.376	0.295	0.658	1.874	2.388
PDE2A	IMAGE:1257170	71.965	0.3	0.37	0.606	0.845		0.095	0.241	0.522	-0.04	0.04
FCHSD2	IMAGE:299128	72.225	0.104	0.347	0.267	0.772	0.273	0.045	-0.03	0.277	0.585	-0.08
P2RY2	IMAGE:141852	72.607	0.059	0.696	1.806	2.159	1.647	0.243	0.095	0.545	1.693	1.383
P2RY6	IMAGE:452588	72.653	-0.061	0.257	0.337	0.502	0.262	0.11	-0.049	0.215	1.916	3.084
ARHGEF17	IMAGE:624577	72.697	0.107	0.456	0.585	1.043	0.442	0.175	0.068	0.33	1.23	1.852
TNFRSF19L	IMAGE:1655750	72.765	0.088	0.58	0.598	1.003	0.756	0.403	0.236	0.542	0.346	-0.144
PLEKHB1	IMAGE:731469	73.022	0.08	0.448	0.799	0.5		0.628		0.592	0.073	0.053
RAB6A	IMAGE:1553280	73.064	0.19	0.591	0.629	1.351	0.384	0.371	0.308	0.359	0.703	0.254
RAB6A	IMAGE:256666	73.064	0.516	0.731	0.508	1.277	0.8	0.544	0.72	0.85	0.801	1.354
UCP2	IMAGE:236034	73.363	-0.063	0.554	0.064	0.586	-0.048	0.029	-0.095	0.114	0.082	0.501
UCP3	IMAGE:628529	73.389	-0.133	-0.126	-0.001	0.267	0.066	-0.179	-0.246	-0.058	1.173	0.861
PME-1	IMAGE:1030791	73.560	0.264	0.516	0.321	0.946	0.615	0.261	0.035	0.442	0.231	-0.125

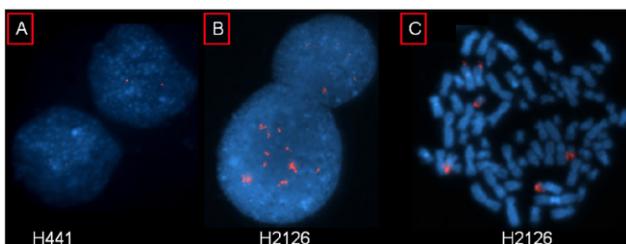
## Análisis de la región amplificada en el cromosoma 19q13.

El amplicón en 19q13 fue identificado en la línea celular H2126. Abarca aproximadamente 1,6Mb (desde la posición 53,5Mb a 55,1Mb) y contiene alrededor de 80 genes conocidos según el mapa actual del genoma humano (**Figura R14**). La amplificación génica de esta región se corresponde con un aumento transcripcional de gran parte de los genes amplificados (**Figura R16**). Al igual que el resto de amplicones, la amplificación fue validada mediante FISH utilizando las sondas RP11-123C1 y RP11-591H17 que contienen los genes *RUVBL2*, *LHB*, *CAGB*, *CGB1*, *CGB2*, *CGB5*, *CGB8*, *CGB2*, *CGB7*, *NTF5*, *KCNA7*, *SNRP70*, *LIN7B*, *PPFIA3*, *HRC*, *TRPM4*. Los núcleos en interfase de la línea H2126 mostraron una conspicua amplificación de la región 19q13 (**Figura R15-B y C**) con un número de copias superior a diez. Mientras que los de la línea celular H441 (**Figura R15-A**) ensayadas en paralelo mostraron una dosis génica normal.

**Figura R14:** Amplicón 19q13. A) Valores obtenidos en los microarrays de CGH para el cromosoma 19 en la línea celular H2126, el amplicón 19q13 se destaca en rojo. B) Detalle de los valores de CGH en el núcleo del amplicón de la región 19q13. C) Posición cromosómica de los BACs utilizados para la validación por hibridación fluorescente *in situ*. D) Posiciones cromosómicas de los genes conocidos en esta región cromosómica según la información actual que se dispone del genoma.



**Figura R15:** Hibridación fluorescente *in situ* del los amplicones 19q13.2 en las líneas A) H441 y B,C) H2126.



## Estudio de la presencia de amplificación en tumores primarios de pulmón.

La presencia de la amplificación en regiones concretas del ADN encontrada en las líneas celulares tiene mayor

importancia si está presente también en tumores primarios. De esta forma se puede concluir que es un fenómeno asociado al proceso tumoral y no un artefacto que ocurre en células en cultivo. Por ello se evaluó la presencia de amplificación génica en estas regiones en tumores primarios de cáncer de pulmón. El estudio se llevó a cabo mediante Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH), utilizando las sondas descritas anteriormente (**Tabla M3**). Para detectar la presencia de falsos positivos por poliploidías se utilizaron siempre sondas control (marcadas en verde) simultáneamente con la sonda problema (marcada en rojo). En el estudio se incluyeron tumores de 25 pacientes diagnosticados con cáncer de pulmón de tipo adenocarcinoma, el mismo tipo histológico que las líneas celulares utilizadas. Los tumores estaban incluidos por duplicados en una matriz tisular (ver apartado materiales y métodos 3.4), que además contenía tejidos normales de control.

La **figura R18** muestra imágenes representativas captadas por FISH. Para todas las regiones fue posible detectar al menos un tumor primario que tuviera amplificación. Se consideraron positivos para amplificación génica a aquellos tumores que presentaban un incremento de al menos 5 copias de la región de interés. Las frecuencias de amplificación fueron las siguientes se muestran en la **tabla R17**.

Los amplicones presentes en las regiones cromosómicas 5p13 y 6p fueron los más frecuentemente encontrados en tumores primarios, y se seleccionaron para ser más estudiados extensivamente, en busca del gen causante de la amplificación (como veremos en secciones posteriores).

## Discusión

La amplificación génica es uno de los mecanismos de activación de proto-oncogenes en los tumores. Como paradigma de proto-oncogenes activados por amplificación se encuentran *ErbB2* amplificado en el 25-30% de los tumores de mama (Slamon, Godolphin et al. 1989) y *N-myc* amplificado en el 40% de neuroblastomas (Brodeur, Seeger et al. 1984). En tumores de pulmón, a pesar del alto grado de inestabilidad cromosómica que presentan, no se conoce ningún proto-oncogen que se amplifique tan recurrentemente (Shiraishi, Noguchi et al. 1989).

En el presente estudio se identificaron mediante el uso de microarrays de hibridación genómica comparada (CGH) cinco regiones diferencialmente amplificadas (5p13, 6p21-22, 11q13, 17q12 y 19q13). Posteriormente se validaron dichas amplificaciones mediante FISH utilizando sondas específicas y se comprobó un aumento relativo en el número de copias génicas de dichas regiones. Aunque la frecuencia individual de cada amplicón en los tumores estudiados no fue muy elevada (siempre inferior al 10%), el número de tumores que presentaba al menos una de las alteraciones era considerablemente alto (28%). Estos datos, junto a las recientes evidencias que relacionan dichos amplicones con una peor supervivencia (Kim, Yim et al. 2005), muestran la relevancia

de dichas alteraciones en el cáncer y subrayan la importancia de dedicar esfuerzos dirigidos a la identificación de los oncogenes contenidos en dichas regiones. A continuación discutiremos los resultados obtenidos para cada amplicón:

El amplicón encontrado en la línea celular Calu3, correspondiente a la región 17q12, sirvió para validar el sistema de análisis utilizado en el presente trabajo, ya que alberga un conocido proto-oncogén *ErbB2/neu*, cuya amplificación se describió por primera vez en dicha línea celular en 1988 (Fukumoto, Shevrin et al. 1988). Estudios más recientes han estimado la media de copias por célula de Calu3 de *ErbB2* en 30 (pudiendo llegar hasta 64 copias/célula) (Bunn, Helfrich et al. 2001).

La corroboración de la amplificación y sobre-expresión de *ErbB2* en la línea Calu3, establece un modelo celular fiable para el estudio en cáncer de pulmón de la transformación por amplificación de dicho oncogén y para estudios de respuesta frente a anticancerígenos utilizados en terapias dirigidas como el *trastuzumab* y *lapatinib*.

El amplicón 11q13 que se encontró en el presente estudio en las líneas celulares H23 y H441, se había detectado anteriormente en tumores de cabeza y cuello, mama, y vejiga. Actualmente, tras más de veinticinco años desde su hallazgo, (Gaudray, Szepetowski et al. 1992), no existe todavía un proto-oncogén que sea firme candidato a ser el gen diana de dicha amplificación. Probablemente, esto sea debido a la presencia de múltiples factores que dificultan su estudio. En primer lugar, los amplicones de esta región suelen abarcar regiones extensas, muchas veces de varias megabases, que contienen decenas o cientos

de genes que se coamplifican (tal y como se ha citado anteriormente para el amplicón Calu3). Además, frecuentemente la región amplificada presenta una estructura compleja (Schwab 1998) en la que pueden estar implicados diferentes fragmentos cromosómicos (Casey, Smith et al. 1986). En concordancia con esta observación, en el presente estudio se ha observado que las líneas H23 y H441 contienen amplificaciones de dos fragmentos cromosómicos cercanos (11q13.2 y 11q13.4) con decenas de genes afectados. Por otra parte, en ocasiones la amplificación génica no se corresponde con sobre-expresión. Así, por ejemplo, los genes *INT2/FGF3*, que fueron los originalmente asociados al amplicón 11q13 (Roelofs, Schuurring et al. 1993; Lin, Smith et al. 2005), presentaban niveles de expresión indetectables en los tumores en que se encontraban amplificados (Lidereau, Callahan et al. 1988).

Con respecto al amplicón 19q13, los datos previos son escasos y cabe destacar una publicación en la que se ha detectado amplificación de esta región en tumores de pulmón (Casey, Smith et al. 1986), proponiéndose como oncogén candidato al a *SPIB*.

Los amplicones situados en las regiones 6p21-23, 5p13, sean quizás hasta el momento de los que menos información se posee. Sin embargo, en el presente trabajo habíamos encontrado sendos amplicones entre los más frecuentemente hallados en tumores primarios, por esta razón nos dispusimos a estudiarlos más extensivamente. Una vez corroborado los datos generados por los microarrays de CGH mediante FISH, utilizamos una técnica más resolutive, la PCR cuantitativa, para determinar el núcleo de los genes amplificados en dichas regiones

**Figura R16:** Tabla de los valores obtenidos a partir de los microarrays de CGH para el amplicón 19q13 en las ocho líneas celulares analizadas. Datos expresados en Log2 (Medianas Cy5/Cy3). Resaltado en verde oscuro los valores >1 y en verde claro los 0.5-1. En azul, se presentan de igual forma los valores de microarrays de ADNc de las líneas H2126.

Gen	CloneID	Mb	Calu3	H23	A427	H441	h522	A549	H1299	H2126	H2126
<b>ATF5</b>	IMAGE:814158	<b>55.124</b>	<b>0.184</b>	<b>0.192</b>	<b>0.277</b>	<b>0.172</b>	<b>0.168</b>	<b>0.245</b>	<b>0.119</b>	<b>0.269</b>	<b>-0.86</b>
<b>CD33</b>	IMAGE:1917430	<b>56.420</b>	<b>-0.06</b>	<b>-0.25</b>	<b>-0.21</b>	<b>-0.58</b>	<b>-0.85</b>	<b>0.054</b>	<b>-0.51</b>	<b>-0.1</b>	<b>-0.95</b>
<b>CGB5</b>	IMAGE:259973	<b>54.218</b>	<b>0.298</b>	<b>-0.01</b>	<b>0.229</b>	<b>-0.1</b>	<b>-0.2</b>	<b>0.486</b>	<b>-0.29</b>	<b>1.209</b>	<b>0.407</b>
<b>FCGRT</b>	IMAGE:770394	<b>54.708</b>	<b>0.377</b>	<b>0.185</b>	<b>0.549</b>			<b>0.554</b>	<b>0.039</b>	<b>0.772</b>	<b>1.755</b>
<b>GYS1</b>	IMAGE:45632	<b>54.163</b>	<b>0.34</b>	<b>-0.07</b>	<b>0.158</b>	<b>-0.32</b>	<b>-0.18</b>	<b>0.382</b>	<b>-0.13</b>	<b>0.934</b>	<b>1.543</b>
<b>IRF3</b>	IMAGE:809353	<b>54.855</b>	<b>0.568</b>	<b>0.42</b>	<b>0.3</b>	<b>0.177</b>	<b>0.403</b>	<b>0.466</b>	<b>0.033</b>	<b>0.768</b>	<b>1.063</b>
<b>KDELR1</b>	IMAGE:184175	<b>53.578</b>	<b>0.119</b>	<b>-0.08</b>	<b>0.067</b>	<b>-0.02</b>	<b>-0.4</b>	<b>0.164</b>	<b>-0.2</b>	<b>0.008</b>	<b>1.011</b>
<b>MGC10204</b>	IMAGE:1554596	<b>54.648</b>	<b>-0.57</b>		<b>0.28</b>			<b>0.324</b>	<b>0.465</b>	<b>-0.9</b>	<b>0.723</b>
<b>NOSIP</b>	IMAGE:753021	<b>54.751</b>	<b>0.145</b>	<b>0.405</b>	<b>0.211</b>	<b>-0.06</b>	<b>-0.18</b>	<b>0.226</b>	<b>-0.15</b>	<b>0.219</b>	<b>0.59</b>
<b>NTF5</b>	IMAGE:130941	<b>54.256</b>	<b>0.723</b>	<b>0.024</b>	<b>0.245</b>		<b>-0.17</b>	<b>0.442</b>	<b>-0.15</b>	<b>1.271</b>	<b>0.284</b>
<b>NUCB1</b>	IMAGE:788472	<b>54.096</b>	<b>0.455</b>	<b>0.119</b>	<b>0.21</b>	<b>0.191</b>	<b>0.341</b>	<b>0.344</b>	<b>0.086</b>	<b>0.622</b>	<b>1.396</b>
<b>PPFIA3</b>	IMAGE:344942	<b>54.314</b>	<b>0.266</b>	<b>0.487</b>	<b>0.423</b>	<b>0.122</b>	<b>0.334</b>	<b>0.852</b>	<b>0.163</b>	<b>1.147</b>	<b>3.345</b>
<b>PPP1R15A</b>	IMAGE:795893	<b>54.067</b>	<b>0.361</b>	<b>-0.37</b>	<b>0.163</b>	<b>0.206</b>	<b>-0.26</b>	<b>0.958</b>	<b>0.355</b>	<b>0.648</b>	<b>0.984</b>
<b>PRRG2</b>	IMAGE:770074	<b>54.778</b>	<b>0.394</b>	<b>0.276</b>	<b>0.235</b>	<b>0.368</b>	<b>0.276</b>	<b>0.622</b>	<b>0.153</b>	<b>0.642</b>	<b>1.913</b>
<b>PTOV1</b>	IMAGE:840658	<b>55.046</b>	<b>0.388</b>	<b>0.443</b>	<b>0.995</b>	<b>-3.55</b>	<b>-3.04</b>	<b>0.645</b>	<b>0.518</b>	<b>0.924</b>	<b>0.954</b>
<b>RPL18</b>	IMAGE:878545	<b>53.810</b>	<b>0.199</b>	<b>-0.16</b>	<b>-0.21</b>	<b>-0.04</b>	<b>-0.29</b>	<b>-0.01</b>	<b>-0.18</b>	<b>-0.01</b>	<b>0.242</b>

Si se tiene en cuenta que las escasas terapias dirigidas actuales que son exitosas contra el cáncer actúan sobre oncogenes, también activados por amplificación como *EGFR* y *ErbB2*, las conclusiones que se pueden derivar del presente trabajo podrían ser no sólo de gran relevancia biológica y clínica para el cáncer, sino terapéutica. Sin embargo es necesario dedicar más estudios que puedan ayudarnos a profundizar en las funciones de estas amplificaciones génicas en cáncer.

**Figura R17:** Frecuencia de amplificaciones en tumores primarios. \*Indica la presencia de amplificación en al menos una de las regiones testadas.

Región	Frecuencia
5p13	2/25
6p21, 6p23	2/25
11q13.2	1/25
17q12	1/25
19q13	1/25
<b>*Total</b>	<b>7/25=28%</b>

## Bibliografía

Alt, F. W., R. E. Kellems, et al. (1978). "Selective multiplication of dihydrofolate reductase genes in methotrexate-resistant variants of cultured murine cells." *J Biol Chem* **253**(5): 1357-70.

Brodeur, G. M., R. C. Seeger, et al. (1984). "Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage." *Science* **224**(4653): 1121-4.

Bruheim, S., M. L. Sandvold, et al. (2013). "Antitumor activity of elacytarabine combined with bevacizumab, cetuximab and trastuzumab in human NSCLC xenografts." *Anticancer Res* **33**(9): 3615-21.

Bunn, P. A., Jr., B. Helfrich, et al. (2001). "Expression of Her-2/neu in human lung cancer cell lines by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization and its relationship to in vitro cytotoxicity by trastuzumab and chemotherapeutic agents." *Clin Cancer Res* **7**(10): 3239-50.

Cappuzzo, F., M. Varella-Garcia, et al. (2005). "Increased HER2 gene copy number is associated with response to gefitinib therapy in epidermal growth factor receptor-positive non-small-cell lung cancer patients." *J Clin Oncol* **23**(22): 5007-18.

Casey, G., R. Smith, et al. (1986). "Characterization and chromosome assignment of the human homolog of int-2, a potential proto-oncogene." *Mol Cell Biol* **6**(2): 502-10.

Dalla-Favera, R., F. Wong-Staal, et al. (1982). "Onc gene amplification in promyelocytic leukaemia cell line HL-60 and primary leukaemic cells of the same patient." *Nature* **299**(5878): 61-3.

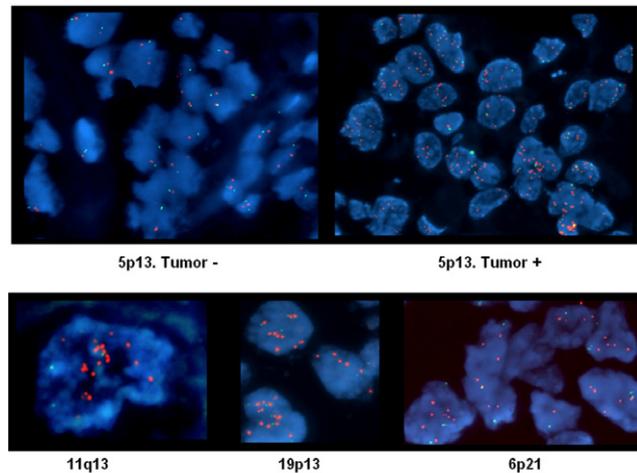
Deininger, M. W. and B. J. Druker (2003). "Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib." *Pharmacol Rev* **55**(3): 401-23.

Fukumoto, M., D. H. Shevrin, et al. (1988). "Analysis of gene amplification in human tumor cell lines." *Proc Natl Acad Sci USA* **85**(18): 6846-50.

Gaudray, P., P. Szepietowski, et al. (1992). "DNA amplification at 11q13 in human cancer: from complexity to perplexity." *Mutat Res* **276**(3): 317-28.

Grob, T. J., I. Kannengiesser, et al. (2012). "Heterogeneity of ERBB2 amplification in adenocarcinoma, squamous cell carcinoma and large cell undifferentiated carcinoma of the lung." *Mod Pathol* **25**(12): 1566-73.

**Figura R18:** Imágenes representativas de la Hibridación Fluorescente in situ (FISH) realizada sobre tumores primarios. En la parte superior se muestra los núcleos de un tumor que presenta una amplificación en la región 5p13 y otro que no. Abajo, imágenes representativas de núcleos de tumores que células que presentan amplificación en las regiones 11q13, 19p13 y 6p21 respectivamente.



Herrero, J., F. Al-Shahrour, et al. (2003). "GEPAS: A web-based resource for microarray gene expression data analysis." *Nucleic Acids Res* **31**(13): 3461-7.

Kim, T. M., S. H. Yim, et al. (2005). "Genome-wide screening of genomic alterations and their clinicopathologic implications in non-small cell lung cancers." *Clin Cancer Res* **11**(23): 8235-42.

Lidereau, R., R. Callahan, et al. (1988). "Amplification of the int-2 gene in primary human breast tumors." *Oncogene Res* **2**(3): 285-91.

Lin, M., L. T. Smith, et al. (2005). "DNA copy number gains in head and neck squamous cell carcinoma." *Oncogene*.

Pinkel, D., R. Seagraves, et al. (1998). "High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays." *Nat Genet* **20**(2): 207-11.

Pollack, J. R., C. M. Perou, et al. (1999). "Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays." *Nat Genet* **23**(1): 41-6.

Roelofs, H., E. Schuurin, et al. (1993). "Amplification of the 11q13 region in human carcinoma cell lines: a mechanistic view." *Genes Chromosomes Cancer* **7**(2): 74-84.

Schwab, M. (1998). "Amplification of oncogenes in human cancer cells." *Bioessays* **20**(6): 473-9.

Shiraishi, M., M. Noguchi, et al. (1989). "Amplification of protooncogenes in surgical specimens of human lung carcinomas." *Cancer Res* **49**(23): 6474-9.

Slamon, D. J., W. Godolphin, et al. (1989). "Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer." *Science* **244**(4905): 707-12.

Swanton, C., A. Futreal, et al. (2006). "Her2-targeted therapies in non-small cell lung cancer." *Clin Cancer Res* **12**(14 Pt 2): 4377s-4383s.

Tsao, M. S., A. Sakurada, et al. (2005). "Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome." *N Engl J Med* **353**(2): 133-44.

# Evaluación de la relación entre factores de riesgo cardiovascular, las lesiones endoscópicas de la papila renal y el tipo de litiasis renal

*Evaluation of the relationship between cardiovascular risk factors, endoscopic lesions of the renal papilla and the type of renal lithiasis*

**Xavier Arnau Sabaté Arroyo, Enrique Carmelo Pieras Ayala, Valentí Tubau Vidaña, Jorge Guimerá García, José Luis Bauzá Quetglas, Pedro Pizá Reus**

*Servei Urología. Hospital Universitari Son Espases*

## Correspondencia

Xavier Arnau Sabaté Arroyo  
Servei Urología. Hospital Universitari Son Espases  
Carretera de Valdemossa, 79 - 07120 Palma  
E-mail: sabate.arnau@gmail.com

Recibido: 15 - I - 2018

Aceptado: 27 - III - 2018

doi: 10.3306/MEDICINABALEAR.33.02.34

## Resumen

**Introducción y objetivos:** Estudiar la relación entre los factores de riesgo cardiovascular más frecuentes con el tipo de lesión endoscópica de la papila renal y el tipo de litiasis renal.

**Material y métodos:** Evaluamos prospectivamente 38 pacientes sometidos a cirugía intrarrenal retrograda (RIRS) analizando y clasificando el tipo de lesión observada en la papila renal (placa de Randall, Calcificación intratubular y hendidura papilar). Posteriormente, se analiza el tipo de litiasis presente (oxalato cálcico monohidrato, ácido úrico y litiasis de oxalato cálcico dihidrato con o sin hidroxapatita) y se recogen los factores de riesgo cardiovascular presentes (HTA, Diabetes Mellitus, Obesidad, Antecedentes de enfermedad cardiaca previa).

Se realiza una comparación de proporciones mediante el test de  $\chi^2$  con valor de significación  $p < 0.05$  para cada grupo.

**Resultados:** No se hallaron relaciones entre el tipo de factor de riesgo cardiovascular con el tipo de calcificación papilar endoscópica. Se observó una tendencia a la presencia de calcificación intratubular en pacientes obesos.

La HTA y la Diabetes Mellitus se relacionaron con las litiasis de ácido úrico ( $p=0,025$  y  $0,005$ , respectivamente). La obesidad se relacionó con las litiasis de oxalato cálcico dihidrato ( $p=0,023$ ).

**Conclusiones:** No parece existir una relación entre los factores de riesgo cardiovascular y el tipo de calcificación de la papila renal. A pesar de ello, se observa la tendencia de que pacientes con obesidad presentan una elevada frecuencia de calcificación intratubular.

Parece que existe una relación entre las litiasis de ácido úrico en pacientes que padecen diabetes y/o HTA y entre las litiasis de oxalato cálcico dihidrato con o sin hidroxapatita en pacientes con obesidad.

**Palabras clave:** Factores de riesgo cardiovascular, litiasis, papila renal, endoscopia.

## Abstract

**Introduction and objectives:** Study the relationship between the most frequent cardiovascular risk factors with the type of endoscopic injury of the renal papilla and the kind of renal lithiasis.

**Material and methods:** We prospectively evaluated 38 patients undergoing retrograde intrarenal surgery (RIRS) by analyzing and classifying the type of injury observed in the renal papilla (Randall's plaque, intratubular calcification and papillary cleft). Later, we analyzed the type of lithiasis present (calcium oxalate monohydrate, uric acid and calcium oxalate dihydrate lithiasis with or without hydroxyapatite) and the cardiovascular risk factors present (HTA, Diabetes Mellitus, Obesity, History of previous heart disease). A proportional comparison was performed using the  $\chi^2$  test with significance value  $p < 0.05$  for each group.

**Results:** No relationship was found between the type of cardiovascular risk factor and the type of endoscopic papillary injury. Although, we find a tendency between the patients with obesity and the intratubular calcification. HTA and Diabetes Mellitus were related with uric acid stones ( $p = 0.025$  and  $0.005$ , respectively). Obesity was related with calcium oxalate dihydrate lithiasis ( $p = 0.023$ ).

**Conclusions:** There not seem to be a relationship between cardiovascular risk factors and the kind of renal papilla injury. In spite of , there is a tendency observed that correlated the patients with obesity with a high frequency of intratubular calcification. There seems to be a relationship between uric acid lithiasis in patients with diabetes or hypertension and another relationship between the calcium oxalate dihydrate lithiasis with or without hydroxyapatite and the patients with obesity.

**Keywords:** Cardiovascular risk factors, lithiasis, renal papilla, endoscopy.

## Introducción

### 1. Epidemiología de la litiasis

La litiasis urinaria representa un problema sociosanitario en toda la población mundial<sup>1,2</sup> presentando un incremento de su prevalencia a lo largo de los años. La prevalencia de urolitiasis en Europa occidental es aproximadamente del 5% y según series afecta del 1 al 15% de la población.<sup>3</sup>

Dicho incremento puede ser un fenómeno mundial en el que se juntan una amplia variabilidad de factores causantes como pueden ser el clima debido al incremento de la temperatura global, cambios en la dieta y el aumento de la diabetes y obesidad.<sup>4,5</sup>

Se trata además de una enfermedad con tasas de recurrencia elevadas. Se estima que entorno el 50% de los pacientes que presenten un episodio litiasico recidivarán en los próximos 5 años, llegando incluso al 70% a los 10 años.<sup>6</sup>

Dicha patología provocará una carga económica al sistema sanitario. En EEUU se estima un coste anual de 2.100 millones de dólares (según datos del año 2000) en la atención de pacientes con nefrolitiasis, suponiendo un aumento del 50% del coste anual desde 1994.<sup>7</sup>

### 2. Epidemiología litiasis renal España

La dificultad para realizar estudios epidemiológicos sobre urolitiasis radica en la falta de registros sanitarios oficiales y en la propia naturaleza de la enfermedad, con un buen número de casos puntuales y sin recidiva. Las encuestas han servido como base para realizar estudios poblacionales, pero son los registros hospitalarios la fuente más empleada para la obtención de datos sobre frecuencia de la litiasis, reflejando únicamente los casos que han requerido atención hospitalaria.

En un estudio publicado en 2007, Sánchez-Martín y col.<sup>8</sup> en el cual hicieron una revisión de trabajos publicados sobre prevalencia e incidencia de la litiasis de España arrojaron cifras dispares que oscilaban en 0,24% al 2,95% en cuanto a las incidencias y entre el 0,1% y 14,3% en cuanto a la prevalencia. Los mismos autores realizaron un cálculo de la media de los datos obteniendo una incidencia del 0,73% y una prevalencia del 5,06% de urolitiasis en España.

En un estudio más reciente sobre la prevalencia de insuficiencia renal crónica en España sobre una muestra mayor de 19 años se encontró una prevalencia de litiasis renal del 13,9%.<sup>9</sup>

### 3. Epidemiología litiasis renal en Islas Baleares

De especial interés para este trabajo, que se ha desarrollado sobre la población de la comunidad autónoma de las Islas Baleares, es el estudio que presentaron en

el año 1994, Grases y col.<sup>10</sup> Dicho grupo publicó un estudio sobre 1500 personas entrevistadas directamente entre 18 y 101 años de edad habitantes en las Islas Baleares. La prevalencia de urolitiasis fue del 14,3% (IC: 11,9%-16,7). El 39,2% de los pacientes presentaban familiares con historia de litiasis renal hecho por el cual no se pudo atribuir únicamente la herencia como causa litógena teniendo que pensar en otros factores causantes de la urolitiasis.

Otro dato importante del estudio, fue la relación entre el tamaño de la ciudad de residencia y la prevalencia de litiasis. En las poblaciones de menos de 500.000 habitantes la prevalencia de urolitiasis ascendió hasta el 22%, mientras que en la ciudad de más de 500.000 habitantes (Palma de Mallorca) la prevalencia fue de 11,8%. Grases y cols atribuyeron dicha diferencia a que los habitantes de las poblaciones pequeñas eran los ciudadanos autóctonos de las Islas Baleares, mientras que en la ciudad de Palma de Mallorca el número de gente foránea era superior a consecuencia del turismo, comercios, etc.

### 4. Edad y sexo

La prevalencia de la litiasis renal ha sido mayor en varones que en mujeres, pero cambios en el estilo de vida así como un incremento de la población obesa parecen responsables de que la diferencia entre hombre y mujeres sea cada vez menor.

La concentración urinaria de calcio es menor en las mujeres que en los hombres hasta los 50 años momento en el cual se equiparan. Se ha atribuido que esta diferencia entre sexos es debido al papel protector de los estrógenos al aumentar la absorción renal de calcio y disminuir la resorción ósea, cosa que disminuiría con la menopausia.

En el hombre, la testosterona puede promover la formación de litiasis al suprimir la osteopontina en el riñón e incrementar la excreción urinaria de oxalato. También se ha visto que niveles elevados de andrógenos plasmáticos se relacionan con la litiasis renal.

Asimismo, se ha visto que por debajo de los 20 años es rara la presencia de litiasis y que su pico de máxima presencia es entre la cuarta y la sexta década de la vida.<sup>2</sup>

## Factores implicados en la litiasis renal

En la formación de los cálculos intervienen varios factores a la vez, que podemos clasificar en extrínsecos (medio-ambientales, condición social, alimentación, hábitos de vida, clima, ...) e intrínsecos (genética, morfoanatomía renal). Al ser una enfermedad multifactorial es difícil interpretar y clarificar las claves de la formación de la litiasis renal, aunque probablemente se deba a la coexistencia de varios factores.

Por lo tanto, la formación de la litiasis depende de múltiples factores y en algunos casos está relacionada con otras entidades patológicas que provocan recidiva litiasica y perpetúan la enfermedad si no se hace un diagnóstico correcto y una prevención adecuada.

### 1. Genéticos

Un 25% de los pacientes con litiasis tienen una historia familiar de cálculos renales,<sup>11</sup> pese a ello los factores específicos genéticos y epigenéticos no quedan del todo claro.

Existen varias enfermedades hereditarias que pueden asociar litiasis renal como por ejemplo la hiperoxaluria primaria, la enfermedad de Dent que asocia defectos en el canal del cloruro, la acidosis tubular renal familiar<sup>12</sup> que asocia nefrolitiasis y nefrocalcinosis en el 70% de los pacientes, la cistinuria con clara base genética con un patrón autosómico recesivo y la xantiniuria y la dihidroxiadeniuria.

### 2. Factores geográficos y climáticos

Existe una mayor prevalencia de litiasis en climas cálidos o secos y en los meses más calurosos del año.<sup>13</sup> Las altas temperaturas producen mayor pérdida de líquido por aumento de sudoración, un débito menor de diuresis y por tanto una mayor probabilidad de cristaluria.<sup>14</sup>

En España se ha reportado variaciones en las estaciones del año con un aumento de cólicos nefríticos durante los meses de verano<sup>15</sup> e incluso llegándose a correlacionar la incidencia y la temperatura.<sup>16</sup>

### 3. Factores ocupacionales

Trabajadores que están expuestos durante el horario laboral a unas temperaturas mayores tienen una incidencia de litiasis mayor que los que no están (8% vs 0,9%).<sup>17</sup> Se observó que los trabajadores más expuestos presentaron un menor volumen de orina y mayor saturación de la misma.<sup>18</sup>

También se ha visto que existe un mayor riesgo de litiasis en sujetos con trabajos sedentarios<sup>15</sup> observando una mayor prevalencia de litiasis en directivos de empresa, funcionarios, profesiones liberales y técnicos superiores. El buen nivel socioeconómico presenta un mayor riesgo para el desarrollo de litiasis.<sup>19</sup>

### 4. Factores dietéticos

En las últimas décadas con el aumento del consumo de comida rápida y bebidas azucaradas ha incrementado los índices de obesidad y también uno de los factores de riesgo para la formación de litiasis.<sup>20</sup>

Uno de los agentes más estudiados ha sido el calcio ya que aproximadamente el 80% de las litiasis contienen calcio. Se puede pensar que una dieta rica en calcio aumenta dicha concentración en la orina y por tanto se desarrollarían más litiasis. En un estudio de Curhan y cols.<sup>21</sup> se observó que una mayor ingesta de calcio en la dieta

disminuye la formación de litiasis renal en mujeres jóvenes pero en cambio en mujeres mayores una ingesta de calcio parecía aumentar el riesgo de litiasis en un 20%.<sup>22</sup>

Otro agente importante son las proteínas animales ya que el consumo excesivo aumenta la excreción urinaria de calcio y disminuye el citrato favoreciendo la formación de litiasis.<sup>22</sup> En un ensayo aleatorizado<sup>23</sup> realizado a cabo en Italia se observó que en pacientes con litiasis recurrentes de oxalato de calcio e hipercalciuria, la ingesta restringida de proteínas animales y sal unido a una ingesta normal de calcio proporcionaba una mayor protección de la recurrencia litiasica.

Por otro lado, el papel del oxalato, componente hallado en la mayoría de cálculos renales estudiados, en la patogénesis de la litiasis es incierta. Solo se ha podido demostrar un leve incremento del riesgo de litiasis con el consumo de oxalatos.<sup>24</sup>

Por el contrario, el citrato se considera un factor protector para el desarrollo de la litiasis. Es un importante inhibidor de la cristalización de sales de oxalato y fosfato cálcico. Se encuentra en frutas y verduras, de tal manera que se recomienda su consumo para evitar la formación de litiasis.<sup>25</sup>

Por último, uno de los factores dietéticos importantes es el aumento de la ingesta de líquidos que aumentaría el volumen de orina y disminuiría la incidencia de litiasis renal.<sup>26</sup>

## Teorías de la formación de la litiasis según lesión renal

### 1. Placa de Randall

La placa en la superficie de la papila fue descrita en 1937 por Alexander Randall, quien estableció la conexión entre una calcificación subepitelial no inflamatoria con el inicio y formación de litiasis.<sup>27</sup> Diferentes investigadores han intentado entender la patogénesis y establecer la conexión con ésta patología. Se ha descrito que según el porcentaje de placa en la papila está directamente relacionado con el número de litiasis, así como el bajo flujo de volumen de orina, el pH bajo de orina y la alta concentración de calcio en orina.<sup>28</sup>

En la formación de la placa de Randall pueden distinguirse cuatro fases. En el inicio, un depósito inicial de hidroxapatita comienza a formarse en la cercanía de la membrana de la zona más estrecha del asa de Henle que es una zona muy rica en colágeno y posteriormente se extiende hacia el intersticio medular encontrándose en íntimo contacto con los vasa recta y los conductos colectores. Después se produce un crecimiento y expansión de la placa facilitando que en el intersticio se produzca un cambio de la misma hacia el urotelio a nivel de la papila renal. Posteriormente, el epitelio que cubre la placa se rompe exponiéndose a la orina pélvica. Al

entra en contacto con la orina actúa de nucleante heterogéneo del oxalato cálcico monohidrato, dando lugar a la formación de cálculos de oxalato cálcico monohidrato papilar típico.

Una cuestión clave es porque se forma el depósito de hidroxiapatita intrapapilar. De hecho, diferentes estudios actuales han demostrado una clara correlación entre el estrés oxidativo y citotóxicos con el desarrollo de estas calcificaciones.

Así, los radicales libres generados como consecuencia del estrés oxidativo dan lugar a la oxidación del colágeno intrapapilar. Esta oxidación genera detritus con una importante capacidad como nucleante heterogéneo de las sales cálcicas. Debido al elevado pH seguido de la formación del fosfato cálcico, fundamentalmente hidroxiapatita, da lugar a la formación de estos depósitos intrapapilares conocidos como placas de Randall.

Existe evidencia de la relación entre la formación de placas de Randall, la edad, las enfermedades cardiovasculares como la hipertensión, el infarto de miocardio, la diabetes, el síndrome metabólico y la enfermedad renal crónica.<sup>29</sup>

Todo parece indicar que la hipótesis de la formación de la placa de Randall es el resultado de una combinación de las teorías anteriormente citadas.

## 2. Plugs de Randall o Calcificación intratubular

La alteración más característica presente en los conductos de Bellini es el taponamiento u obstrucción de los mismos, y en la actualidad no se ha podido demostrar una relación directa entre este proceso y la formación de litiasis. Es de suponer que el contacto directo de este tapón del conducto de Bellini con una orina sobresaturada de oxalato o fosfato cálcico podría favorecer la nucleación de hidroxiapatita y de oxalato cálcico. Estudios microscópicos del tapón muestran la presencia única de hidroxiapatita en el mismo en pacientes formadores de litiasis de esta composición; sin embargo, cuando se trata de pacientes formadores de brushita, generalmente el tapón suele tener una composición mixta incluyendo además de la brushita, hidroxiapatita y oxalato cálcico.<sup>30</sup> Existen dos teorías en cuanto a la formación de una litiasis a partir de un tapón del conducto de Bellini. Se considera que este tipo de lesiones producen una necrosis del túbulo distal y por tanto un daño tisular a nivel de la papila renal.

Una posibilidad sería que la litiasis creciera sobre una zona obstruida del conducto, considerándose que parte de la litiasis desprendida tuviese restos de la composición del tapón. La otra posibilidad es que un crecimiento excesivo del tapón provoque un desprendimiento del mismo quedando libre a nivel de los cálculos o pelvis renal facilitando la formación de una matriz con su posterior cristalización. Al igual que ocurre en el caso anterior, deberían existir trazas del tapón originario en la litiasis neoformada.<sup>31</sup>

A diferencia de lo que sucede con la placa de Randall, en la que se forma la litiasis a partir de orinas de composición normal, en este caso se considera se necesita la presencia de alteraciones urinarias importantes (hipercalcemia y/o pH superiores a 6).

El diámetro del túbulo tiene una relación importante ya que un único cristal es demasiado pequeño para ocluir el túbulo y es probable que necesite de unirse en las paredes del túbulo distal siguiéndose del crecimiento y unión de otros cristales. Estos cristales que se forman deben ser alargados y a medida que crecen van atrapando el túbulo. La agregación de sales y la expansión de la litiasis, sobretodo en pacientes formadores de litiasis, ocurre en un corto espacio de tiempo.

Se ha sugerido que el flujo de orina dentro de los túbulos renales sigue un movimiento peristáltico.<sup>32</sup> Este movimiento turbulento puede incrementar la posibilidad de contacto del cristal con la pared del túbulo y fomentar su agregación. La velocidad del flujo urinario puede variar dependiendo de la zona pero considerándose más lento a nivel distal que es donde se originaría la litiasis.

## Descripción lesiones de la papila renal

A medida que la tecnología endoscópica renal avanza y con el aumento de la comodidad y destreza de los cirujanos en técnicas endoscópicas, ésta intervención se realiza con mayor frecuencia para el tratamiento de los pacientes con litiasis renal.

Se trata de una técnica, en el que a través de un tutor ureteral, permite el acceso de un uteroscopio flexible de pequeño diámetro a la cavidad renal con el fin de realizar una exploración y un tratamiento directo sobre la litiasis, ya sea a través de fragmentación de la litiasis con láser o de su extracción directa (siempre que permita su extracción a través de la vaina de acceso ureteral).

Dichas técnicas de exploración y tratamiento intrarrenales permiten una observación más precisa de las papilas renales y por tanto de las lesiones que se puedan hallar dentro de ella.

Resulta interesante estudiar la correlación de la imagen endoscópica (tubular o subepitelial-intersticial), con los distintos tipos de cálculos. La endoscopia digital permite actualmente el estudio, la visualización, tipificación y gradación de las lesiones papilares observadas en los pacientes litiasicos. Por otra parte, resulta también interesante comprobar cómo los patrones endoscópicos de los pacientes con sobresaturación urinaria (litiasis de brushita, acidosis tubular, hiperparatiroidismo) son distintos a la placa de Randall tipo 1, predominando las calcificaciones tubulares de los túbulos colectores calcificación de Randall tipo 2.

### 1. Placa de Randall (Calcificación tipo 1)

Se trata de una placa característicamente de color blanco que se dispone de forma irregular en la papila renal y con la capacidad de aparecer en cualquier parte de la papila. La placa se ha observado tanto en pacientes que tienen nefrolitiasis como en pacientes que no tienen nefrolitiasis. No se ha conseguido mostrar que la presencia de la placa de Randall provoque daño a nivel de la nefrona.<sup>33</sup> (Figuras 1 y 2).

### 2. Calcificación intratubular (plug) o calcificación tipo 2

La calcificación intratubular o plug se puede manifestar de dos maneras. Una es como un depósito amarillo visualizado en la superficie de la papila renal o protruyendo desde la boca de un ducto renal dilatado.<sup>34</sup> La otra manifestación es a través de un ducto dilatado donde el plug ha existido previamente. El tamaño normal de una

ducto de Bellini es entre 300 y 600 micrómetros aunque dilatado puede aumentar varias veces su diámetro. (Figuras 3 y 4).

### 3. Erosión papilar

La erosión papilar se define como una lesión focal en la superficie de la papila renal, como la presencia de una especie de cráter. Éste tipo de lesión se pone de manifiesto cuando existe una progresión de la enfermedad y un daño de la nefrona bastante importante. Se cree que este tipo de lesiones pueden ser creados por dos vías. La primera podría ser una evolución de la calcificación intratubular que produce una atrofia y pérdida de las nefronas renales. La otra vía sería por un daño mecánico y espontáneo por el paso de una litiasis en el urotelio papilar ya que ha sido observado en imágenes de microscopio electrónico.<sup>35</sup> (Figuras 5 y 6).

Figura 1



Figura 2



Figura 3



Figura 4



Figura 5

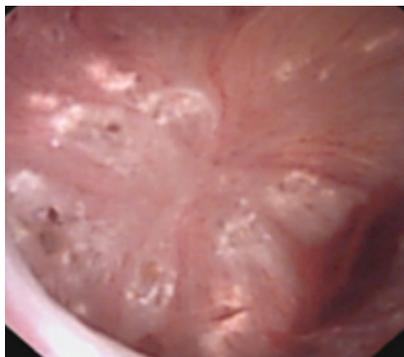


Figura 6



## Material y métodos

De forma prospectiva y aleatoria, se han seleccionado 40 pacientes comprendidos entre 18 y 80 años que se les realizó la indicación de cirugía litiasica intrarrenal retrógrada (RIRS) en las Consultas Externas de Urología en nuestro departamento según el método habitual basado en las guías clínicas y los protocolos del servicio.

Previamente informados de la cirugía y con el consentimiento informado firmado, se programaron los pacientes para la cirugía renal.

Durante la cirugía intrarrenal (RIRS) se realizó una exploración sistemática de las papilas renales describiendo la presencia o no de Placa de Randall, Calcificación Intratubular y Hendidura Papilar, pudiendo existir o no en la misma papila los diferentes tipos de lesión papilar de forma sincrónica.

Posteriormente a la cirugía, se realizó un análisis por estereoscopia, microscopía electrónica y espectrografía infrarroja del tipo de litiasis en el Instituto Universitario de Investigación de Ciencias de la Salud (IUNICS) alojado

en la Universitat de les Illes Balears. Se clasificaron las litiasis en los siguiente grupos: Oxalato cálcico monohidrato (COM), Oxalato cálcico dihidrato con o sin hidroxipatita (COD) y Ácido úrico (AC).

Se recogieron de forma retrospectiva los factores de riesgo cardiovascular como la presencia de Hipertensión Arterial, Diabetes Mellitus, Obesidad y antecedentes de enfermedad cardíaca previa. Los diferentes parámetros de riesgo cardiovascular se recogieron de la siguiente manera:

- Hipertensión arterial (HTA): presencia de tensión arterial sistólica mayor o igual a 140mmHg y/o tensión arterial diastólica mayor o igual a 90 mmHg en dos tomas distintas o paciente bajo tratamiento antihipertensivo.
- Diabetes Mellitus (DM): Glucemias persistentemente mayores a 115 mg/dL en ayunas o paciente bajo tratamiento con hipoglucemiantes.
- Enfermedad cardíaca previa (CV): Paciente con antecedente de accidente vascular cerebral, infarto agudo de miocardio o angor hemodinámico.
- IMC: Se calculó el Índice de Masa Corporal de cada paciente con la fórmula de:  $IMC = \text{Peso (kg)} / \text{Altura (m)}^2$
- Estado nutricional: Con el IMC calculado previamente, se han clasificado los pacientes en normopeso (IMC: 18-25), sobrepeso (IMC: >25-30), obesidad tipo I (IMC: >30-35) y obesidad tipo II (IMC: >35-50). Se dividieron los pacientes en normopeso y sobrepeso vs obesidad tipo I y II.

Se analizaron descriptivamente según el factor de riesgo cardiovascular la presencia del tipo de lesión renal endoscópica y el tipo de litiasis renal hallada.

Se realizó estudio estadístico de los diferentes factores de riesgo con cada tipo de variable mediante con el programa SPSS.

## Resultados

El total de pacientes estudiados fueron 40. Se descartaron 2 pacientes al no poder obtener muestra de litiasis para su estudio durante el acto quirúrgico.

La edad media de los pacientes tratados fue de 48 años (De 18 años a 80 años). 17 pacientes eran mujeres (44%) y 21 pacientes eran hombres (56%).

El tamaño medio de la litiasis tratada fue de 15,3 mm (DE 7,2mm).

Presentaban diagnóstico de HTA 13 pacientes (34%), Diabetes Mellitus 8 pacientes (21%), obesidad 12 pacientes (31%) y antecedentes de cardiopatía isquémica 6 pacientes (15%).

Las siguientes características descriptivas por tipo de factor de riesgo se clasificaron en la **tabla I**.

Se realizó una comparación de proporciones mediante el test de  $\chi^2$  con valor de significación  $p < 0,05$  para cada grupo.

La comparación se realizó entre cada tipo de factor de riesgo de forma independiente con cada tipo de calcificación hallada y con cada tipo de litiasis hallada durante la cirugía.

No se hallaron relaciones entre el tipo de factor de riesgo cardiovascular con el tipo de calcificación papilar endoscópica. Aunque se observó una tendencia en los pacientes con obesidad a presentar calcificación intratubular.

La HTA y la Diabetes Mellitus se relacionó con las litiasis de ácido úrico ( $p=0,025$  y  $0,005$ , respectivamente).

La obesidad se relacionó con las litiasis de oxalato cálcico dihidrato ( $p=0,023$ ).

## Discusión

Los factores de riesgo más frecuentes hallados en los pacientes con litiasis estudiados fueron la obesidad y la HTA, encontrándose aproximadamente en 1 de cada 3 pacientes.

La media de edad de los pacientes con factores de riesgo cardiovascular se encuentran entorno a los 60 años a excepción de la obesidad que su media de edad se en-

Tabla I

	HTA	Diabetes Mellitus	Antecedentes de cardiopatía isquémica	Obesidad
Número de pacientes (N total =38)	13 (34%)	8 (21%)	6 (15%)	12 (31%)
Edad (años)	58 (39 a 80)	59 (46 a 77)	66 (55 a 80)	50 (31 a 80)
Sexo	M= 11 (84%), F=2 (16%)	M= 4 (50%), F=4 (50%)	M= 6 (100%)	M= 6 (50%), F= 6 (50%)
Placa de Randall	9 (69%)	4 (50%)	4 (66%)	7 (58%)
Calcificación intratubular	10 (76%)	6 (75%)	5 (83%)	11 (91%)
Hendidura papilar	6 (46%)	4 (50%)	2 (33%)	4 (33%)
COM	4 (30%)	1 (12%)	2 (33%)	2 (16%)
COD	4 (30%)	2 (25%)	1 (16%)	10 (83%)
Ácido úrico	5 (38%)	5 (62%)	3 (50%)	0

cuentra en 50 años demostrando que los factores dietéticos y la alimentación hacen que la enfermedad litiasica aparezca de forma precoz.

El tipo de lesión endoscópica que más frecuentemente se observó en todos los tipos de factores de riesgo cardiovasculares fue la calcificación intratubular. El hecho de que la calcificación intratubular aparezca de forma tan mayoritaria en los pacientes con factores de riesgo cardiovascular puede indicar que su mecanismo de formación o de crecimiento, y por tanto, de la litiasis que desarrolle, se vea estimulado u originado por alteraciones sistémicas del organismo.

Cabe destacar, que prácticamente la totalidad de pacientes con obesidad (91%) presentaron calcificaciones intratubulares en la papila renal volviendo una vez más a demostrarse el importante papel de los factores dietéticos y la alimentación con la litiasis renal. A pesar de ello, no se encontró una relación estadísticamente significativa entre la obesidad y la calcificación intratubular.

Tanto la Placa de Randall como la Hendidura Papilar parecen tener un mecanismo de formación independiente a las alteraciones sistémicas del organismo.

Las litiasis de ácido úrico se relacionaron de forma estadísticamente positiva en aquellos pacientes que presentaban HTA o Diabetes Mellitus de forma independiente. Es conocido que pacientes con Diabetes Mellitus presentan una orina con pHs más acidóticos y por tanto, son más propensos a la formación de este tipo de litiasis. Por otro lado, no queda tan claro el mecanismo fisiopatológico por el cual la HTA se relaciona con las litiasis de ácido úrico.

Las litiasis de oxalato cálcico dihidrato con o sin hidroxapatita se relacionaron de forma estadísticamente positiva con la obesidad. Se considera que uno de los posibles

orígenes de las litiasis de oxalato cálcico dihidrato es la calcificación intratubular que casualmente fue la lesión endoscópica que más frecuentemente se encontró en los pacientes obesos. Todo ello parece relacionar, que los pacientes obesos tienen más tendencia a tener calcificaciones intratubulares que posteriormente acabarán produciendo litiasis de oxalato cálcico dihidrato. Sería interesante observar la bioquímica de orina de los pacientes obesos con litiasis de oxalato cálcico dihidrato, ya que probablemente se observe la presencia de hiper calciuria y pH elevados.

Por otro lado, las litiasis de oxalato cálcico monohidrato no se relacionaron de forma estadísticamente positiva con ningún tipo de factor de riesgo cardiovascular pudiendo indicar que dentro de su mecanismo de formación no parecen influenciar las alteraciones sistémicas del organismo teniendo otra vía de formación distinta.

## Conclusiones

No parece existir una relación entre los diferentes tipos de factores de riesgo cardiovascular y el tipo de calcificación de la papila renal.

A pesar de ello, se observa la tendencia de que pacientes con obesidad presentan una elevada frecuencia de calcificación intratubular.

Las litiasis de ácido úrico se relacionan con aquellos pacientes que tienen HTA o diabetes de forma independiente.

Las litiasis de oxalato cálcico dihidrato con o sin hidroxapatita se relacionan con los pacientes con obesidad. Reforzando la teoría de que pacientes obesos presentan calcificaciones intratubulares que posteriormente acabarán dando litiasis de oxalato cálcico dihidrato.

## Bibliografía

1. Romero V, Akpınar H, Assimos DG. Kidney stones: a global picture of prevalence, incidence, and associated risk factors. *Rev Urol*.
2. Shoag J, Tasian GE, Goldfarb DS, Eisner BH. The new epidemiology of nephrolithiasis. *Adv Chronic Kidney Dis*.
3. Yasui T, Iguchi M, Suzuki S, Kohri K. Prevalence and epidemiological characteristics of urolithiasis in Japan: national trends between 1965 and 2005. *Urology* 2008;71(2):209-13.
4. De SK, Liu X, Monga M. Changing trends in the American diet and the rising prevalence of kidney stones. *Urology*. 2014;84(5):1030-3.
5. Fukuhara H, Ichianagi O, Kakizaki H, Naito S, Tsuchiya N. Clinical relevance of seasonal changes in the prevalence of ureterolithiasis in the diagnosis of renal colic. *Urolithiasis [Internet]*. 2016;44(6):529-37.
6. Lieske JC, Peña de la Vega LS, Slezak JM, Bergstralh EJ, Leibson CL, Ho K-L, et al. Renal stone epidemiology in Rochester, Minnesota: An update. *Kidney Int [Internet]*. 2006;69(4):760-4.
7. Pearle M, Calhoun E, Curhan G, Urologic Diseases of America Project: Urolithiasis. *J Urol*. 2005;173(3):848-57.
8. Sánchez-Martín FM, Millán Rodríguez F, Esquena Fernández S, Segarra Tomás J, Rousaud Barón F, Martínez-Rodríguez R, et al. Incidencia y prevalencia de la urolitiasis en España: Revisión de los datos originales disponibles hasta la actualidad. *Actas Urológicas Españolas*.2007;31(5):511-20.
9. Otero A, de Francisco A, Gayoso P, García F, EPIRCE Study Group. Prevalence of chronic renal disease in Spain: results of the EPIRCE study. *Nefrología*. 2010;30(1):78-86.
10. Grases F, Conte A, March G, Genestar C, Costa-bauzá A, Martín M, et al. Epidemiology of Urinary Stone Disease in the Balearic Islands Community. *Int Urol Nephrol* 1994;26(2):145-50.
11. Alapont Pérez FM, Gálvez Calderón J, Varea Herrero J, Colome Borros G, Olaso Oltra A, Sánchez Bisoso JR. [Epidemiology of urinary lithiasis]. *Actas Urol Esp*. 2001;25(5):341-9.
12. Dretler SP, Coggins CH, McIver MA, Thier SO. The physiologic approach to renal tubular acidosis. *J Urol*. 1969;102(6):665-9.
13. Soucie JM, Thun MJ, Coates RJ, McClellan W, Austin H. Demographic and geographic variability of kidney stones in the United States. *Kidney Int*.1994;46(3):893-9.
14. Prezioso D, Illiano E, Piccinocchi G, Cricelli C, Piccinocchi R, Saita A, et al. Urolithiasis in Italy: An epidemiological study. *Arch Ital di Urol e Androl*.2014;86(2):99.
15. Pérez JAH, Pálmes M de la PP, Ferrer JFL, Urdangarain OO, Nuñez AB. Renal colic at emergency departments. Epidemiologic, diagnostic and etiopathogenic study. *Arch Esp Urol*.2010;63(3):173-87.
16. Cepeda Delgado M, López Izquierdo R, Amón Sesmero JH, Del Pozo Vegas C, Álvarez Manzanares J. Epidemiological Characteristics of Renal Colic and Climate-Related Causes in a Continental Area in Spain. *Urol Int*.2015;95(3):309-13.
17. Atan L, Andreoni C, Ortiz V, Silva EK, Pitta R, Atan F, et al. High kidney stone risk in men working in steel industry at hot temperatures. *Urology*.2005;65(5):858-61.
18. Borghi L, Meschi T, Amato F, Novarini A, Romanelli A, Cigala F. Hot occupation and nephrolithiasis. *J Urol*.1993;150(6):1757-60.
19. Robertson WG, Peacock M, Heyburn PJ, Hanes FA. Epidemiological risk factors in calcium stone disease. *Scand J Urol Nephrol Suppl*.1980;53:15-30.
20. De SK, Liu X, Monga M. Changing Trends in the American Diet and the Rising Prevalence of Kidney Stones. *Urology*.2014;84(5):1030-3.
21. Curhan GC, Willett WC, Speizer FE, Spiegelman D, Stampfer MJ. Comparison of dietary calcium with supplemental calcium and other nutrients as factors affecting the risk for kidney stones in women. *Ann Intern Med*.1997;126(7):497-504.
22. Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, Stampfer MJ. A Prospective Study of Dietary Calcium and Other Nutrients and the Risk of Symptomatic Kidney Stones. *N Engl J Med*.1993;328(12):833-8.
23. Borghi L, Schianchi T, Meschi T, Guerra A, Allegri F, Maggiore U, et al. Comparison of Two Diets for the Prevention of Recurrent Stones in Idiopathic Hypercalciuria. *N Engl J Med*.2002;346(2):77-84.
24. Taylor EN, Curhan GC. Oxalate Intake and the Risk for Nephrolithiasis. *J Am Soc Nephrol*.2007;18(7):2198-204.
25. Curhan GC, Willett WC, Speizer FE, Stampfer MJ. Intake of vitamins B6 and C and the risk of kidney stones in women. *J Am Soc Nephrol*.1999;10(4):840-5.
26. Borghi L, Meschi T, Amato F, Briganti A, Novarini A, Giannini A. Urinary volume, water and recurrences in idiopathic calcium nephrolithiasis: a 5-year randomized prospective study. *J Urol*.1996;155(3):839-43.
27. Randall A. The origin and growth of renal calculi. *Ann Surg*.1937;105(6):1009-27.
28. Evan AP. Physiopathology and etiology of stone formation in the kidney and the urinary tract. *Pediatr Nephrol*.2010;25(5):831-41.
29. Khan SR. Is oxidative stress, a link between nephrolithiasis and obesity, hypertension, diabetes, chronic kidney disease, metabolic syndrome? *Urol Res*.2012;40(2):95-112.
30. Evan AP, Lingeman JE, Worcester EM, Sommer AJ, Phillips CL, Williams JC, et al. Contrasting Histopathology and Crystal Deposits in Kidneys of Idiopathic Stone Formers Who Produce Hydroxy Apatite, Brushite, or Calcium Oxalate Stones. *Anat Rec*. 2014;297(4):731-48.
31. Gambaro G, Trinchieri A. Recent advances in managing and understanding nephrolithiasis/nephrocalcinosis. *F1000Research*.2016;5:695.
32. Moe SM. Vascular calcification and renal osteodystrophy relationship in chronic kidney disease. *Eur J Clin Invest*.2006;36(s2):51-62
33. Evan AP, Lingeman JE, Coe FL, Parks JH, Bledsoe SB, Shao Y, et al. Randall's plaque of patients with nephrolithiasis begins in basement membranes of thin loops of Henle. *J Clin Invest*.2003;111(5):607-16.
34. Evan AP, Coe FL, Gillen D, Lingeman JE, Bledsoe S, Worcester EM. Renal intratubular crystals and hyaluronan staining occur in stone formers with bypass surgery but not with idiopathic calcium oxalate stones. *Anat Rec (Hoboken)*.2008;291(3):325-34.
35. Evan AP, Lingeman JE, Coe FL, Shao Y, Parks JH, Bledsoe SB, et al. Crystal-associated nephropathy in patients with brushite nephrolithiasis. *Kidney Int*.2005;67(2):576-91.

# Análisis de la dinámica poblacional de las infecciones respiratorias agudas pediátricas causadas por virus (2015-2016)

*Analysis of the population dynamics of pediatric acute respiratory infections caused by viruses (2015-2016)*

**Jordi Reina, Ester del Barrio, Carmen Morales, María Busquets, Cristina Norte**

*Unidad de Virología, Servicio de Microbiología.  
Facultad de Medicina Universitat Illes Balears. Hospital Universitario Son Espases.*

## Correspondencia

Jordi Reina

Unidad de Virología, Servicio de Microbiología

Hospital Universitario Son Espases

Carretera de Valldemossa, 79. 07010 - Palma de Mallorca

E-mail: jorge.reina@ssib.es

**Recibido:** 22 - I - 2018

**Aceptado:** 29 - III - 2018

**doi:** 10.3306/MEDICINABALEAR.33.02.42

## Resumen

**Introducción:** La dinámica poblacional establece de que forma los diferentes virus interactúan entre sí y como va modificándose esta relación del tiempo. Los virus muy estacionarios presentaran interacciones menos estables pero más acumuladas y por ello mas tendentes a afectar a un solo individuo. Es importante conocer el comportamiento complejo de las poblaciones víricas que determinan las infecciones respiratorias agudas (IRA) en la población general.

**Pacientes y método:** Se ha estudiado la etiología viral de todos los pacientes pediátricos (<15 años) que acudían a urgencias con sintomatología clínica compatible con una IRA durante el período comprendido entre enero de 2015 y diciembre de 2016. La detección viral se ha realizado mediante una técnica comercial de amplificación genómica molecular tipo RT-PCR en tiempo real. Se realiza una comparación de proporciones mediante el test de  $\chi^2$  con valor de significación  $p < 0.05$  para cada grupo.

**Resultados:** En este estudio se han analizado 10.642 muestras respiratorias (4.323 en 2015 y 6.319 en 2016) con una positividad global del 47% (42.2% en 2015 y 50.3% en 2016). El número de infecciones mixtas detectadas ha sido de 203 (11.2%) en 2015 y 344 (10.8%) en 2016; sumando conjuntamente 547 casos (10.9%). Se ha observado como el porcentaje de virus que se detectan en cada uno de los meses ha ido variando a lo largo del año, predominando en invierno. El porcentaje acumulado de infecciones mixtas ha variado con cada uno de los diferentes virus respiratorios, siendo sólo los rinovirus y adenovirus los detectados en todos los meses del año. En ningún mes se ha podido detectar la totalidad de los virus de forma simultánea. Además de las infecciones mixtas dobles (dos virus respiratorios) también se han detectado co-infecciones triples (tres virus simultáneos). El número de casos ha sido de 65 lo representan el 1.5% de todas las muestras positivas.

**Conclusiones:** Aunque todavía no ha podido demostrarse que las infecciones respiratorias víricas mixtas tengan un peor pronóstico evolutivo sobre el paciente, si parece evidente el carácter potenciador de las mismas sobre el parénquima pulmonar. Por todo ello se hace necesario estudiar y analizar periódicamente la dinámica poblacional de este tipo de virus para conocer las tendencias epidemiológicas de los mismos.

**Palabras clave:** Dinámica poblacional, virus respiratorios, epidemiología, infección respiratoria aguda, pediatría.

## Abstract

**Introduction:** Population dynamics establish how the different viruses interact with each other and how this time relationship changes. Very stationary viruses present less stable but more accumulated interactions and therefore tend to affect a single individual. It is important to know the complex behavior of viral populations that determine acute respiratory infections (ARI) in the general population.

**Patients and method:** The viral etiology of all pediatric patients (<15 years) who came to the emergency room with clinical symptoms compatible with an ARI during the period between January 2015 and December 2016 has been studied. Viral detection has been performed using a commercial technique of molecular genomic amplification type RT-PCR in real time.

**Results:** In this study 10,642 respiratory samples were analyzed (4,323 in 2015 and 6,319 in 2016) with an overall positivity of 47% (42.2% in 2015 and 50.3% in 2016). The number of mixed infections detected was 203 (11.2%) in 2015 and 344 (10.8%) in 2016; totaling 547 cases (10.9%). It has been observed how the percentage of virus detected in each of the months has been varying throughout the year, predominating in winter. The accumulated percentage of mixed infections has varied with each of the different respiratory viruses, with only rhinoviruses and adenoviruses being detected in all months of the year. In no month has it been possible to detect all the viruses simultaneously. In addition to dual mixed infections (two respiratory viruses), triple co-infections (three simultaneous viruses) have also been detected. The number of cases was 65, representing 1.5% of all positive samples.

**Conclusions:** Although it has not yet been demonstrated that mixed viral respiratory infections have a worse evolutionary prognosis on the patients, if the potentiating nature of the lung parenchyma seems evident. Therefore, it is necessary to study and periodically analyze the population dynamics of this type of virus to know the epidemiological trends of the same.

**Keywords:** Population dynamics, respiratory viruses, epidemiology, acute respiratory infection, pediatrics.

## Introducción

Las infecciones respiratorias agudas (IRAs) constituyen una de las patologías infecciosas que afectan con mayor frecuencia a la población en general. Las causas por virus pueden presentarse como brotes epidémicos durante los meses invernales, como el Virus Respiratorio Sincitial (VRS) o los virus gripales, o bien de forma continua a lo largo del año (adenovirus o rinovirus).<sup>1,2</sup>

Los virus implicados en las IRAs son múltiples y diversos, aunque la mayoría son virus con genoma de tipo ARN, existen dos excepciones (adenovirus y bocavirus) que poseen un genoma de tipo ADN. Esta característica genérica parece determinar un comportamiento epidemiológico algo distinto.<sup>1-3</sup>

La distribución etiológica de estos virus a lo largo del año determina porcentajes variables de incidencia y correlación entre ellos. Se postula la existencia de un porcentaje mínimo de IRAs de etiología viral que siempre existen en cualquier momento del año. Esta prevalencia varía en función de la edad, época del año y área geográfica considerada.<sup>1,2</sup>

Todos estos parámetros son esenciales para intentar conocer lo que se denomina dinámica poblacional y que analiza no sólo las infecciones víricas respiratorias aisladas o únicas, sino aquellas en las que están implicadas más de un virus (co-infecciones o infecciones mixtas).<sup>3,4</sup>

Es necesario conocer la totalidad de virus respiratorios que infectan a un individuo ya que la evolución y el pronóstico del proceso clínico va a depender de la dependencia, interdependencia o antagonismo de los virus detectados en un paciente.<sup>5,6</sup>

La dinámica poblacional establece de qué forma los diferentes virus respiratorios interactúan entre sí y como va modificándose esta relación a lo largo del año. Aquellos virus muy estacionarios presentarían interacciones menos estables pero más acumuladas y por ello más tendientes a afectar a un solo individuo. A medida que va disminuyendo la población viral circulante (meses calurosos) los virus implicados presentan mayor tendencia a infectar en solitario y a ser directamente los responsables del proceso respiratorio.<sup>1-3</sup>

A pesar de que todavía no se ha podido demostrar que las infecciones víricas respiratorias mixtas (más de un virus) presenten una mayor morbilidad y/o mortalidad que las causadas por un solo virus, sí parece evidente que la población viral infectante afecta patogénicamente en elementos celulares o fisiológicos distintos determinando un comportamiento biológico más amplió.<sup>7-9</sup>

Por todo ello nos ha parecido interesante conocer la dinámica poblacional y el comportamiento complejo de las poblaciones víricas que determinan las IRAs en la población general.

## Pacientes y métodos

A lo largo del período comprendido entre enero de 2015 y diciembre de 2016 se ha estudiado la etiología viral de todos los pacientes pediátricos (<15 años) que acudían a urgencias con sintomatología clínica compatible con una IRA.

Todas las muestras respiratorias (aspirado nasofaríngeo en menores de 3 años y frotis faríngeo en mayores de esta edad) fueron procesadas para la detección de los virus respiratorios.

La detección viral se ha realizado mediante una técnica de amplificación genómica molecular tipo RT-PCR en tiempo real comercial que permite la detección simultánea y diferencial de 16 virus respiratorios diferentes (Allplex Respiratory Panel; Seegen, Corea del Sur). Se ha considerado como positiva toda muestra que mostrara la presencia de algún virus respiratorio. Se ha considerado infección mixta si la muestra presentaba más de un virus distinto con criterio genómico de positividad.<sup>10</sup>

## Resultados

En este estudio se han analizado 10.642 muestras respiratorias (4.323 en 2015 y 6.319 en 2016) con una positividad global del 47% (42.2% en 2015 y 50.3% en 2016). El número de infecciones mixtas detectadas ha sido de 203 (11.2%) en 2015 y 344 (10.8%) en 2016, sumando conjuntamente 547 casos (10.9%).

En la **figura 1** se presenta el número de casos mixtos en cada uno de los meses del año en los dos años del estudio. Los meses de noviembre y diciembre en ambos años han presentado el mayor número de infecciones víricas mixtas. El número de casos en este período en 2015 fue de 121 (59.6%) y en 2016 de 123 (35.7%), representando globalmente este período bimensual el 44.6% de todas las infecciones mixtas.

Los porcentajes de detección de las infecciones mixtas en cada uno de los meses anuales se presentan en la **figura 2**. Porcentualmente los meses con un mayor número de casos en 2015 correspondieron a noviembre (26.3%) y diciembre (26.4%), aunque en 2016 el porcentaje mayor se detectó en diciembre (18.1%) seguido de junio (15.7%). En este último año los porcentajes de detección han estado casi siempre por encima de los observados en 2015, salvo los dos meses finales.

Se ha observado como el porcentaje de virus que se detectan en cada uno de los meses ha ido variando. Así la **figura 3** muestra el porcentaje de detección de cada virus en los 12 meses del año. Sólo el rinovirus y el adenovirus (12.5%) se han detectado en el 100% de los meses, es decir en todo el año (**Figura 4**). La mayoría (62.5%) de los virus se han detectado en el 60% de los

meses y sólo uno de ellos el virus parainfluenza tipo 2 lo ha sido en un único mes.

Al estudiar el número acumulado de virus respiratorios detectados en los dos últimos años (máximo 32/mes) se observa como el número más elevado se observa en el primer y último trimestre del año (**Figura 5**). En ningún mes se ha podido detectar la totalidad de los virus de forma simultánea. Los porcentajes de detección acumulados en cada uno de los meses se presentan en la **figura 6**. El pico de mayor incidencia corresponde a febrero (87.5%) y diciembre (84.3%), observándose una gráfica que confirma el predominio de estos virus en los meses más fríos y su descenso hasta cerca del 40% durante los meses de verano.

El porcentaje acumulado de infecciones mixtas ha variado con cada uno de los diferentes virus respiratorios. Así en la **figura 6** se presentan los porcentajes acumulados de co-infecciones de cada uno de los principales grupos víricos detectados. Sólo tres virus (bocavirus, adenovirus y enterovirus) han presentado un porcentaje de infecciones respiratorias mixtas por encima del 50%. El virus con menor tendencia a las infecciones mixtas ha sido el virus gripal tipo A y los virus parainfluenza, alcanzando tan solo el 15% de todas las IRAs en las que fueron detectados.

Además de las infecciones mixtas dobles (dos virus respiratorios) también se han detectado co-infecciones triples (tres virus simultáneos) (**Figura 7**). El número de casos ha sido de 65 lo representan el 1.5% de todas las muestras positivas. En la **figura 8** se presenta el número de casos detectados por cada virus respiratorio. Se comprueba como el rinovirus y adenovirus son los que han mostrado más casos de infecciones respiratorias triples. En la **figura 9** se exponen los porcentajes de participación de los principales grupos víricos en las infecciones víricas triples. Destaca que el primer grupo vírico en este tipo de IRAs son los virus parainfluenza.

## Discusión

La detección de infecciones víricas múltiples en un mismo paciente es intuitivamente no sorprendente y no inhabitual. Este hecho es frecuente en los pacientes inmunodeprimidos pero no tanto en las personas sanas.<sup>3,5,11</sup> El papel que biológicamente desempeña cada uno de los diferentes virus detectados en una muestra humana es relevante desde el punto de vista patogénico y patológico (3,5,6). Se ha descrito procesos víricos cooperativistas, simbióticos y potenciadores que modifican la respuesta inmunológica del huésped.<sup>12-14</sup>

Las IRAs son una entidad con una elevada frecuencia en la población general. Se calcula que entre el 10-30% de los menores de 15 años (población infantil) desarrollan este tipo de infección cada año. En el caso de los

adultos el porcentaje es algo menor oscilando entre el 5-15%, acumulándose en los meses invernales.<sup>11,15-17</sup>

Si además de ser las IRAs muy frecuentes, les añadimos que pueden estar ocasionadas como mínimo por unos 16 virus respiratorios, se produce el fenómeno biológico que facilita las infecciones mixtas y los procesos de interacción entre ellos; el estudio de la dinámica poblacional en este tipo de patología es extremadamente importante.<sup>10,11,18</sup>

En este estudio se confirma la elevada positividad, y por ello la rentabilidad de las muestras, detectada en las muestras respiratorias; casi la mitad (47%) de todas ellas dieron resultados de etiología viral. Este porcentaje coincide con otros estudios aunque varía en función de la época del año, la edad de los pacientes y la zona geográfica analizada.<sup>15-17</sup>

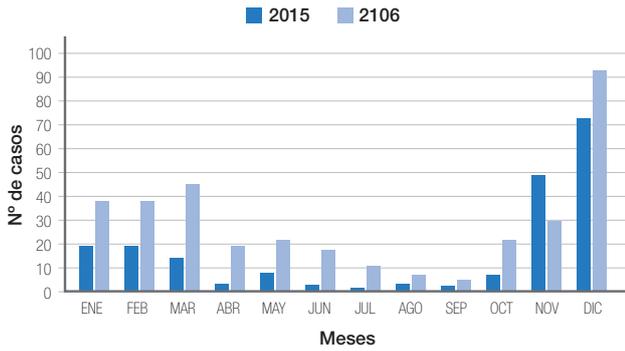
El porcentaje de co-infecciones o infecciones mixtas víricas ha alcanzado el 10% de todas ellas, valor un poco inferior al descrito en otros estudios, pero debe considerarse como valor medio, ya que dependiendo del virus, los porcentajes son muy superiores. Así Harada et al.<sup>9</sup> han comunicado un porcentaje global del 18% y Debiaggi et al.<sup>19</sup> del 22%, alcanzando valores de entre el 25-45% en virus como el rinovirus y el adenovirus.

En aquellos meses invernales en los que predominan y circulan la mayoría de virus respiratorios se ha detectado los porcentajes más elevados de infecciones mixtas; así entre noviembre y diciembre, coincidiendo con los brotes epidémicos del virus respiratorio sincitial (VRS) y el inicio de la gripe, se ha detectado un porcentaje global del 44.6%. En un meta-análisis epidemiológico realizado por Waner et al.<sup>3</sup> se confirma este valor e incluso puede superar el 55% en estudios asiáticos.

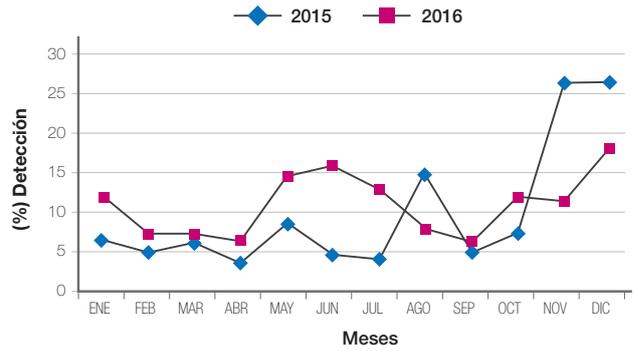
De los diferentes virus detectados sólo los rinovirus y los adenovirus se han presentado a lo largo de todos los meses del año; es por ello que a su vez sean uno de los que con mayor frecuencia se han detectado como co-infecciones respiratorias. El rinovirus es el principal virus detectado en las IRAs de cualquier grupo etario o patológico, por ello la valoración de su significado etiológico es compleja.<sup>15,20,21</sup> Al ser un virus comensal del tracto respiratorio superior, su presencia en muchas de esta zona anatómica podría considerarse como un contaminante, aunque varios estudios si valoran su poder neumotrópico y neumopatogénico cuando se detecta en muestras del tracto respiratorio inferior como el lavado broncoalveolar o los broncoaspirados.<sup>15,20</sup>

Desde el punto de vista epidemiológico el 62.5% de todos los virus respiratorios se pueden detectar en el 60% de todos los meses del año. Sólo el VRS y los virus gripales presentan un comportamiento mucho más restrictivo. A pesar de ello en ningún mes se ha podido detectar la totalidad de los virus estudiados. De acuerdo con

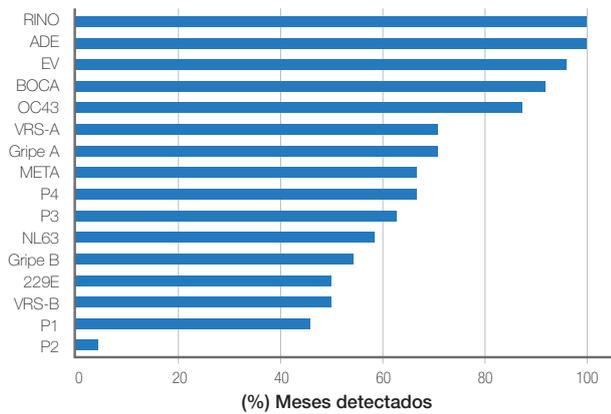
**Figura 1:** Casos de infecciones respiratorias víricas mixtas detectados en los dos años de estudio.



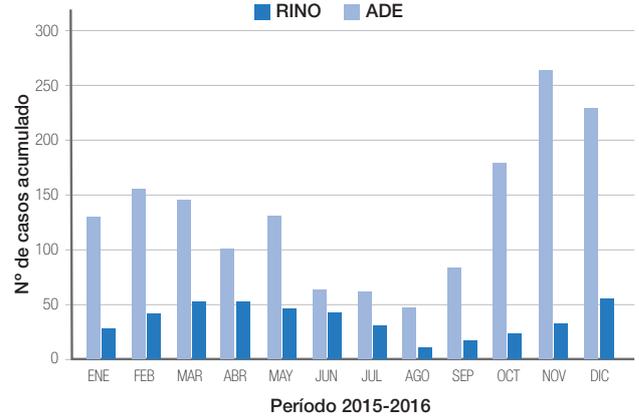
**Figura 2:** Porcentajes de infecciones respiratorias víricas mixtas detectados en los dos años de estudio.



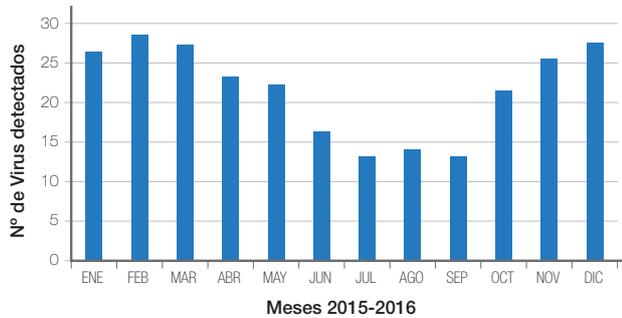
**Figura 3:** Porcentajes acumulados de detección de los diferentes virus respiratorios en los 12 meses de los años 2015 y 2016.



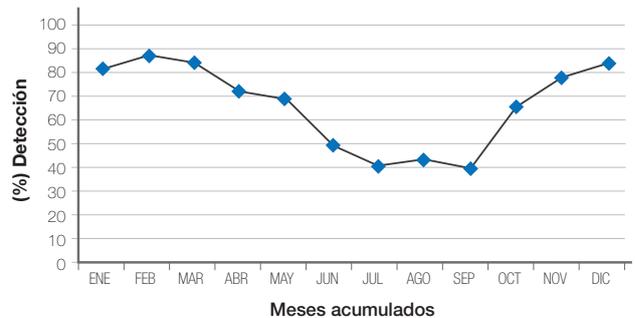
**Figura 4:** Distribución acumulada de los casos de IRA causados por el Rinovirus y el Adenovirus a lo largo de los meses.



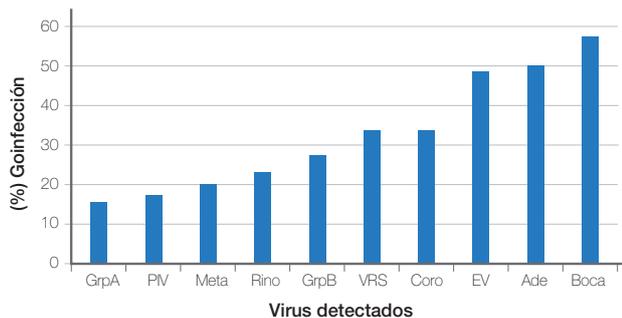
**Figura 5:** Número acumulado de virus respiratorios detectados en los dos años del estudio.



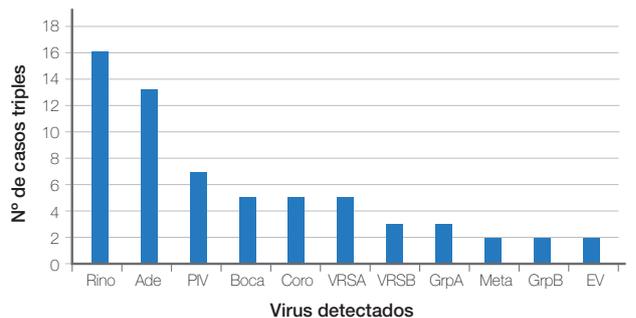
**Figura 6:** Porcentajes de detección viral acumulados detectados en los dos años de estudio.



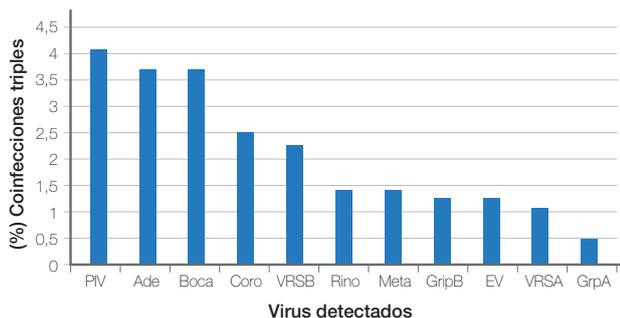
**Figura 7:** Porcentajes acumulados de coinfecciones (infecciones mixtas) detectados en cada uno de los grupos víricos (2015-2016).



**Figura 8:** Casos de infecciones víricas triples detectados en los dos años de estudio.



**Figura 9:** Porcentajes de detección de las infecciones víricas triples en cada uno de los virus detectados.



algunas hipótesis existiría un nicho ecológico de virus respiratorios que de forma dinámica y continua estarían variando dependiendo de las condiciones meteorológicas.<sup>2,3</sup> Cuando se introducen los virus estacionales (VRS y gripe) se produce un desplazamiento del resto de virus respiratorios; este hecho se constata con el dato de que estos virus pueden llegar a ser el 70% de los detectados en estos períodos invernales.<sup>12,13</sup>

A partir de la desaparición ecológica de estos virus, el resto se introduce de forma progresiva, gradual y competitiva en el nicho respiratorio de modo que el porcentaje de positividad en los casos de IRA no desciende por debajo del 25% a lo largo de todo el año. Este comportamiento dinámico y sustitutivo ha sido descrito en modelos animales y humanos y viene favorecido por procesos naturales de competitividad en el ecosistema del tracto respiratorio superior.<sup>2,3</sup>

Tal y como ya se ha mencionado hay algunos virus cuyo porcentaje de co-infección es superior al 50%; en nuestro estudio les ha correspondido al bocavirus, adenovirus y enterovirus, datos semejantes a los comunicados en estudios similares.<sup>9,22,23</sup> A pesar de la elevada prevalencia del virus gripal durante las epidemias estacio-

nales, ha sido junto al virus parainfluenza, los que han mostrado menor tendencia a co-infectar al ser humano. Los diferentes estudios sobre el comportamiento epidemiológico de los virus gripales ya habían demostrado este comportamiento de predominancia durante su circulación humana.<sup>11,16</sup>

Aunque las co-infecciones mixtas causadas por dos virus distintos ha sido lo predominante, también hemos podido detectar un 1.5% de infecciones respiratorias triples, es decir causadas por tres virus distintos y simultáneos. Existen varios estudios que aportan datos similares, de modo que se acepta que este tipo de infección se produce entre el 1-3%.<sup>3,12</sup> Los virus implicados en ellas pueden ser todos con mayor o menor frecuencia; la dinámica cooperante o potenciadora de este tipo de infección respiratoria no ha podido establecerse y aunque son más frecuentes en pacientes inmunodeprimidos, su porcentaje en personas sanas no es despreciable.<sup>2,3,12</sup>

Aunque todavía no ha podido demostrarse que las infecciones respiratorias víricas mixtas tengan un peor pronóstico evolutivo sobre el paciente, si parece evidente el carácter potenciador de las mismas sobre el parénquima pulmonar.<sup>5,6,9</sup> Muchas de estas IRAs tan solo reflejan los estados de colonización o portabilidad previa del paciente; debe recordarse que los rinovirus son comensales habituales de las fosas nasales<sup>20</sup> y los adenovirus se mantienen de forma latente con fases reactivas en las adenoides humanas.<sup>12</sup> Por todo ello se hace necesario estudiar y analizar periódicamente la dinámica poblacional de este tipo de virus para conocer las tendencias epidemiológicas de los mismos.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses.

## Bibliografía

1. Ren L, Gonzalez R, Wang Z, Xiang Z, Wang Y, Zhu T et al. Prevalence of human respiratory viruses in adults with acute respiratory tract infections in Beijing, 2005-2007. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15:1146-53.
2. Tregoning JS, Schwarze J. Respiratory viral infection in infants: causes, clinical symptoms, virology and immunology. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23:74-98.
3. Waner JL. Mixed viral infections: detection and management. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7:143-51.
4. Sly PD, Jones CM. Viral co-detection in infants hospitalized with respiratory disease: it is important to detect?. *J Pediatr* 2011; 87:277-80.
5. Franz A, Adams O, Williams R. Correlation of viral load respiratory pathogens and co-infections with disease severity in children hospitalized for lower respiratory tract infections. *J Clin Virol* 2010; 48:239-45.
6. Martin ET, Kuypers J, Wald A. Multiple versus single virus respiratory infections: viral load and clinical disease severity in hospitalized patients. *Influenza Other Respi Viruses*. 2012; 6:71-7.
7. Richard N, Komurian-Pradel F, Javouhey E. The impact of dual viral infection in infants admitted to a pediatric intensive care unit associated with severe bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J* 2008; 27:213-7.
8. Harada Y, Kinoshita F, Yoshida LM, Ninh LN, Suzuki M, Morimoto K et al. Does respiratory virus coinfection increase the clinical severity of acute respiratory infection among children infected with respiratory syncytial virus?. *Pediatr Infect Dis J* 2013; 32:441-5.
9. Calvo C, Garcia-Garcia ML, Blanco C, Vazquez MC, Frias ME, Perez-Breña P et al. Multiple simultaneous viral infections in infants with acute respiratory tract infections in Spain. *J Clin Virol* 2008; 268-72.
10. Kim HK, Oh SH, Yun KA, Sung H, Kim MN. Comparison of Anyplex II RV16 with the xTAG respiratory viral panel and Seeplex RV15 for detection of respiratory viruses. *J Clin Microbiol* 2013; 51:1137-41.
11. Hilleman MR, Hamparian VV, Ketler A, Reilly CM, McClelland L, Cornfeld D et al. Acute respiratory illness among children and adults. Field study of contemporary importance of several viruses and appraisal of the literature. *JAMA* 1962; 180:445-53.
12. Paranhos-Baccala G, Komurian-Pradel F, Richard N, Vernet G, Lina B, Floret D et al. Mixed respiratory virus infections. *J Clin Virol* 2008; 43:407-10.
13. Canducci F, Debiaggi M, Sampaolo M. Two-year prospective study of single infections and co-infections by respiratory syncytial virus and viruses identified recently in infants with acute respiratory disease. *J Med Virol* 2008; 80:716-23.
14. Kouni S, Karakitsos P, Chranioti A, Theodoridou M, Chrossus G, Michos A. Evaluation of viral co-infections in hospitalized and non-hospitalized children with respiratory infections using microarrays. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19:772-7.
15. Lefkowitz LB, Jackson GG. Dual respiratory infection with parainfluenza and rhinovirus: pathogenesis of transmitted infection in volunteers. *Am Rev Respir Dis* 1966; 93:519-28.
16. Mathur US, Bentley DW, Hall CB. Concurrent respiratory syncytial virus and influenza A infections in the institutionalized elderly and chronically ill. *Ann Intern Med* 1980; 93:49-52.
17. Subbarao EK, Griffis KJ, Waner JL. Detection of multiple viral agents in nasopharyngeal specimens yielding respiratory syncytial virus (RSV). An assessment of diagnostic strategy and clinical significance. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1989; 12:327-32.
18. Aberle JH, Aberle SW, Pracher E, Hutter HO. Single versus dual respiratory virus infections in hospitalized infants: impact on clinical course of disease and interferon-gamma response. *Pediatr Infect Dis J* 2005; 24:605-10.
19. Debiaggi M, Canducci F, Caresola ER, Clementi M. The role of infections and coinfections with newly identified and emerging respiratory viruses in children. *Virol J* 2012; 9:247.
20. Jacobs SE, Lamson DM, St. George K, Walsh TJ. Human rhinoviruses. *Clin Microbiol Rev* 2013; 26:135-61.
21. Brandt CD, Kim HW, Rodriguez WJ, Arrobio JO, Jeffries BC, Parrott RH. Simultaneous infections with different enteric and respiratory tract viruses. *J Clin Microbiol* 1986; 23:177-9.
22. Stempel HE, Martin ET, Kuypers J, Englund JA, Zerr DM. Multiple viral respiratory pathogens in children with bronchiolitis. *Acta Paediatr* 2009; 98:123-6.
23. Tristram DA, Miller RW, McMillan JA, Weiner LB. Simultaneous infection with respiratory syncytial virus and other respiratory pathogens. *Am J Dis Child* 1988; 142:834-6.

# Calidad en citología de cérvix: importancia de la toma

*Quality in cervical cytology: the importance of how to take it*

**Ana Forteza, Mariana Oliveras, Javier Cortés**

*Laboratorio de Citología Dr. Cortés*

---

## Correspondencia

Javier Cortés Bordoy

Laboratorio de Citología Dr. Cortés

Alfonso el Magnánimo, 29 · 07004 - Palma

E-mail: cortes@oceas.es

**Recibido:** 18 - I - 2018

**Aceptado:** 28 - III - 2018

doi: 10.3306/MEDICINABALEAR.33.02.48

## Resumen

Mediante un análisis prospectivo de material propio, se concluye de forma muy significativa que el uso de una torunda de algodón para la toma citológica endocervical debe ser eliminado: un 81% de las muestras no representativas y por lo tanto ineficaces para cubrir el objetivo citológico preventivo fueron tomadas con torunda. El uso del cepillo *ad hoc* es exigible.

**Palabras clave:** Citología, calidad.

## Abstract

By means of a prospective analysis of own material, it is concluded very significantly that the use of a cotton swab to take endocervical cytology should be eliminated: 81% of the samples are not representative and therefore ineffective to cover the preventive cytological objective. They were taken with a swab. The use of the *ad hoc* brush is required.

**Keywords:** Cytology, quality.

## Introducción

Para que la citología de cérvix cumpla su objetivo preventivo al máximo nivel –la detección de lesiones intraepiteliales de cérvix (LIE)<sup>1</sup>– es necesario que en todo su procedimiento de aplicación se cumplan los requisitos de calidad bien documentados en el Consenso Bethesda<sup>2</sup>, y recogidos con amplitud en la “Guía de cribado del cáncer de cuello de útero en España, 2014”<sup>1</sup>, y que son:

- Acreditación adecuada de los responsables del Laboratorio.
- Procedimientos de control de calidad internos y externos establecidos.
- Seguimiento y cierre de los casos detectados.

Nuestro Laboratorio cumple los tres requisitos. En este informe se centra en el segundo de ellos, específicamente en el relativo a la calidad de las tomas recibidas, aspecto clave: está aceptado que si una extensión citológica cervical no contiene de manera representativa células de los epitelios glandular endocervical y metaplásico debe ser considerada de bajo valor predictivo para LIE, al no ser representativa de la zona de anclaje preferente<sup>3</sup> del virus papiloma humano, agente causal de la LIE y del cáncer de cérvix<sup>4</sup>.

## Material y métodos

Durante noviembre 2017 en nuestro Laboratorio se han recibido 1.830 citologías de cérvix. 864 han sido leídas e informadas por uno de los firmantes de este informe: representan significativamente el 47% del total recibido. Se han considerado computables para esta revisión las de mujeres entre 25 y 45 años (379), tramo de edad que concentra la incidencia de la gran mayoría de LIE<sup>1</sup>.

## Resultados

De las 379 citologías incluidas, 81 (21%) no contaban con representación celular endocervical o metaplásica en el extendido.

Hemos correlacionado la ausencia de material celular adecuado con el instrumento usado para la toma endocervical, torunda de algodón (7 casos) o cepillo *ad hoc* (22 casos): 67 de las muestras no representativas habían sido obtenidas con torunda, un 82%.

## Conclusiones

Si queremos que la citología cervical rinda adecuadamente su nivel de eficacia exigible en la detección de la LIE y del cáncer cervical, además de confiar su lectura e informe a un Laboratorio acreditado que cumpla con los necesarios controles de calidad internos y externos, debemos inexcusablemente usar un cepillo ad hoc para

la toma endocervical y desechar de forma definitiva el uso de la torunda de algodón. No hacerlo significa mala práctica y disminuir de forma muy notable la capacidad preventiva de la citología cervical.

**Conflicto Intereses:** Ninguno.

## Bibliografía

1. Tomé A, del Pino M, Cusidó M, Alameda F, Andía D, Castellsagué X et al: Guía de cribado del cáncer de cuello de útero en España, 2014. Prog Obstet Ginecol 2014; 57 (Supl 1): 1-57.
2. Nayar R, Wilbur DC: The Pap Test and Bethesda 2014. Acta Cytologica 2015;59:121-32
3. Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, et al.: Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis J Virol. 2004;78:11451-60.
4. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV et al: Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol. 1999; 189: 12-9.

# Incidentaloma en atención primaria

*Incidentaloma in primary health care*

**Yolanda Gómez López, Mónica Sorribas Morlán, Rafael Hernandez Silva,  
Maria Antonia Nigorra Vich, Cristina Guerra Feo, Salvador Gastoso Gayà**

*Centro de atención primaria Son Pisà*

## Correspondencia

Yolanda Gómez López

Centro de atención primaria Son Pisà.

Carrer de Vicenç Joan i Rosselló, 65 · 07011 - Palma de Mallorca

Tel.: 685 573 934 – E-mail: yglmch@gmail.com

Recibido: 3 - I - 2018

Aceptado: 30 - III - 2018

doi: 10.3306/MEDICINABALEAR.32.02.50

## Resumen

Presentamos el caso de un hombre de 39 años de Mali, que consultó por una Gonalgia izquierda y por una masa dura en la parte externa del tercio inferior del muslo. Hay una importante barrera del lenguaje.

El examen de la rodilla fue anodino con la integridad de todas las estructuras ligamentosas y meniscales y la atención se centró en la palpación de un tumor duro, plano y redondeado a nivel del tercio inferior y la cara externa del muslo izquierdo.

Se refiere a haber sido tratado en la sala de emergencias del hospital hace unos meses por un accidente con contusión en la misma pierna.

Revisamos la radiología realizada en el hospital donde se observó una imagen calcificada en espiral en el área correspondiente a la lesión palpable, que sería compatible con una forma adulta del nematodo calcificado *Dracunculus medinensis*.

**Palabras clave:** *Dracunculus medinensis*, gusano de guinea, gonalgia.

## Abstract

We present the case of a 39-year-old man from Mali, who consulted for a left Gonalgia and for a hard mass on the outside of the lower third of the thigh. There is an important language barrier.

The examination of the knee was anodyne with integrity of all the ligamentous and meniscal structures and attention was focused on the palpation of a hard, flat and rounded tumor at the level of the lower third and outer face of the left thigh.

He refers to having been treated in the hospital emergency room a few months ago for an accident with contusion on the same leg.

We reviewed the radiology done at the hospital where a spiral calcified image was seen in the area corresponding to the palpable lesion, which would be compatible with an adult form of the calcified nematode *Dracunculus medinensis*.

**Keywords:** *Dracunculus medinensis*, guinea-worm, gonalgia.

## Descripción del caso

Se trata de un varón de 39 años, natural de Mali, que reside en España desde 1999, y que presenta una importante barrera idiomática. Viene a nuestra consulta de atención primaria en el centro de salud Son Pisà, sito en Palma de Mallorca, con cita programada.

Como único antecedente de interés consta en su historia hepatitis B curada. Consulta por gonalgia izquierda y porque a la palpación se nota una tumoración dura en la cara externa del tercio inferior del muslo. Comenta que hace unos meses tuvo un accidente de tráfico, fue atendido en urgencias hospitalarias donde realizaron una radiografía de la rodilla afectada, fue dado de alta con tratamiento antiinflamatorio.

A la exploración, el paciente presentaba constantes normales, la exploración de ambas rodillas era normal con integridad de todas las estructuras ligamentosas y meniscales, se palpaba una tumoración redondeada, plana y de consistencia dura de unos 2-3 centímetros de diámetro mayor.

Revisamos la radiografía de la rodilla izquierda realizada en su visita a urgencias, y comprobamos que se visualiza una imagen de densidad calcio, en forma de espiral en tercio inferior de cara externa del muslo izquierdo (**Figura 1**)

Figura 1: Radiografía de rodilla izquierda con imagen calcificada espiroidea.

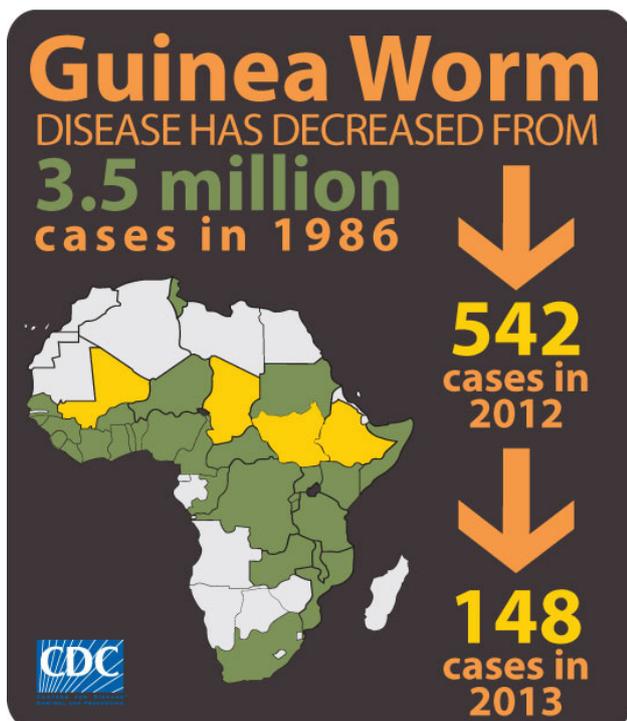


## Discusión

La Dracunculosis es una enfermedad provocada por un nematodo parásito del hombre llamado *Dracunculus medinensis* o gusano de Medina o Guinea. La enfermedad se contrae al ingerir agua contaminada con copépodos (pulgas de agua) infectadas.

Concretamente en Mali se la conoce como “la enfermedad de granero vacío”, ya que, aunque no es letal, el pico del periodo de infección suele coincidir con la temporada agrícola y los síntomas impiden a los afectados realizar una vida normal, por lo que no recogen las cosechas y los graneros quedan vacíos.

Figura 2: Cambios epidemiológicos de la Dracunculosis.



La distribución geográfica del parásito comprendía regiones de África, Asia y América, pero las campañas mundiales de erradicación iniciadas en la década de los 80 por la Organización Mundial de la Salud, ha reducido su presencia a 4 países: Chad, Etiopía, Malí y Sudán del Sur (Figura 2).

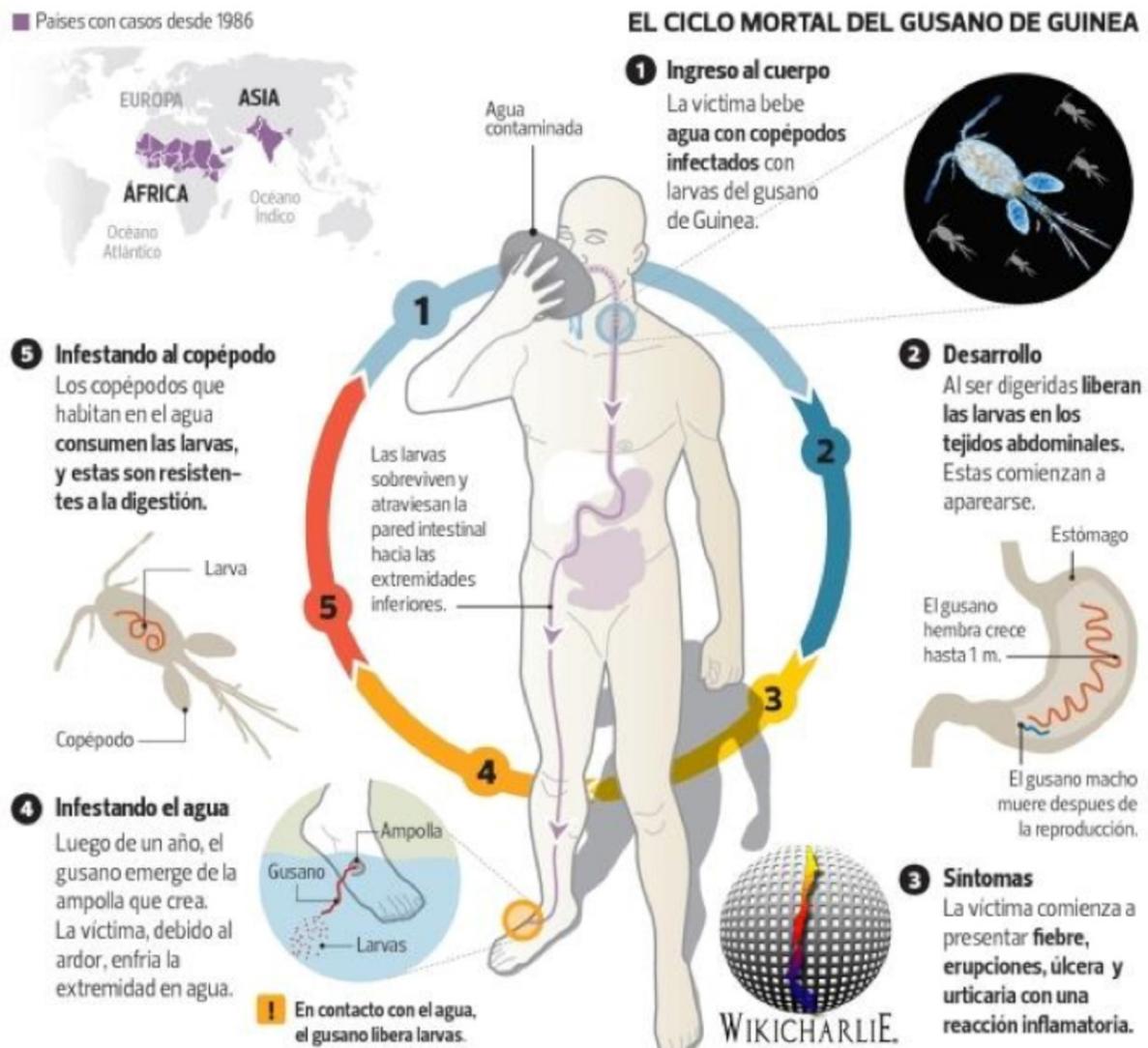
El ciclo vital (Figura 3) tiene lugar cuando los copépodos, que viven en aguas estancadas, ingieren larvas del parásito, el hombre bebe agua contaminada y las larvas son liberadas en el intestino, penetran la mucosa y migran a través de la vía linfática, hasta llegar al tejido peritoneal donde maduran y se aparean, luego viajan por el tejido conectivo subcutáneo, por lo general de piernas y pies. Aquí la hembra grávida adulta penetra en la dermis con la consecuente aparición de reacción inflamatoria y formación de una vesícula muy dolorosa, por donde emerge el nematodo y el dolor por esta lesión dérmica se alivia al sumergirla en agua. Pasados unos 3-5 días las vesículas se rompen y emerge hasta 5 centímetros del parásito (Figura 4), esta salida es dolorosa y puede prolongarse hasta 6 semanas. La media de longitud el nematodo es de un metro - metro y medio.

La dracunculosis tiene un período de incubación de 9 a 14 meses, después en un 60% de los casos aparece una vesícula, previamente a la aparición de estas lesiones los pacientes pueden experimentar una reacción alérgica sistémica que dura 24 horas: rash urticariano generalizado, eritema, edema angioneurótico, prurito, fiebre, sibilancias, náuseas y vómitos, que ceden de manera progresiva.

Para acelerar la expulsión, se puede enrollar el parásito en un trozo de madera y traccionar cada día unos centímetros.

La enfermedad puede dar complicaciones, las más frecuentes son las infecciones bacterianas secundarias, que pueden cursar con abscesos, úlceras crónicas, celulitis,

Figura 3: Ciclo vital de *Dracunculus medinensis*.



necrosis local y ocasionalmente septicemia. La infección secundaria por tétanos es la más grave y puede ser letal. Como secuelas destacan: artritis séptica, sinovitis, anquilosis fibrosa y contractura de los tendones.

Se diagnostica fundamentalmente por la clínica y reconocimiento de la forma adulta del parásito emergiendo de una úlcera en miembros inferiores, también en frotis del líquido que drenan las úlceras. Pruebas inmunológicas como la inmunofluorescencia indirecta puede ser útil, pero no se utilizan. Los rayos X pueden detectar formas calcificadas del parásito.

La serología no es lo suficientemente específica.

El diagnóstico diferencial ha de hacerse con el ántrax, celulitis profunda, goma, oncocercosis, miositis focal aguda y periostitis.

Figura 4: Salida del gusano por úlcera cutánea.



Se recomienda sumergir diariamente (unos 30 min) la extremidad afectada en agua limpia con el fin de vaciar de larvas el útero del gusano hembra, hasta que desaparezcan y estirar suavemente del extremo del verme, que está saliendo del cuerpo, y enrollarlo en un fragmento de madera, unos cuantos centímetros cada día. Suelen requerirse unos 15 días como promedio para extraer el parásito por completo.

## Juicio clínico

En el caso que presentamos, nuestro paciente no relataba la clínica típica de la infección por *Dracunculus medinensis*, tampoco recordaba si había sufrido los síntomas mientras vivía en Mali, puede que contrajera la enfermedad en la infancia y quedara una forma adulta hembra en el tejido conectivo subcutáneo, que con el

paso del tiempo se calcificó. Creemos que se trata de una hembra por el tamaño, ya que los machos suelen ser de unos 2 cm.

Es cierto que, para tener un diagnóstico definitivo, se debería extirpar la lesión y hacer a un análisis anatómico-patológico, pero teniendo en cuenta la benignidad del proceso y que no cambia el pronóstico ni la actitud terapéutica, no se realizó finalmente. Nos ceñimos a las características epidemiológicas del paciente y de la imagen radiológica de la lesión para establecer el diagnóstico.

Cabe mencionar que, según la OMS, la dracunculosis es una enfermedad a punto de ser erradicada, en el año 2016 se registraron tan sólo 25 casos en el mundo, pero no por ello debemos olvidarla a la hora de hacer diagnóstico diferencial.

## Bibliografía

1. Programa de la biblioteca digital Greenstones [Internet]. Cuba. Microbiología y Parasitología Médicas. Tomo III, Capítulo 105. Disponible en: <http://gsdl.bvs.sld.cu/cgi-bin/library>
2. Organización mundial de la salud [Internet]. Ginebra; 2017 [actualizado en enero de 2017] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs359/es>
3. Nutman TB, Weller PF. Filariasis e infecciones relacionadas. En: Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, et al, editores. Harrison principios de Medicina Interna. Vol 2. 18a ed. Nueva York: McGraw-Hill; 2012
4. Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado, Volume 11, Issue 53, April 2014, Pages 3129-41

# Carcinoma células pequeñas vesical y colitis fulminante

*Small-cell bladder carcinoma and fulminant colitis*

**Beatriz Crespo Martín<sup>1</sup>, Héctor Rodrigo Lara<sup>2</sup>, Evelin Horvath<sup>3</sup>,  
Isabel Amengual Antich<sup>2</sup>, Manuel del Rio Vizoso<sup>4</sup>, Elisa Torres del Pliego<sup>4</sup>**

1. Servicio Medicina Interna 2. Servicio Anatomía Patológica 3. Servicio Oncología Médica 4. Unidad de Hospitalización a Domicilio  
Hospital Universitario Son Espases

## Correspondencia

Elisa Torres del Pliego  
Unidad de Hospitalización a domicilio, Planta 0, modulo F  
Hospital Universitario Son Espases  
Carretera de Valldemossa, 79 - 07010 - Palma de Mallorca  
E-mail: elisa.torres@ssib.es

Recibido: 22 - I - 2018

Aceptado: 30 - III - 2018

doi: 10.3306/MEDICINABALEAR.32.02.54

## Resumen

Varón de 60 años con neoplasia vesical de células pequeñas en tratamiento quimioterápico y con diversas manipulaciones urológicas que presenta colitis fulminante y muerte.

**Palabras clave:** colitis fulminante, carcinoma células pequeñas vesical y *C.difficile*.

## Abstract

A 60-year-old man with small-cell bladder neoplasia under chemotherapeutic treatment and several urological manipulations that ends in fulminant colitis and death.

**Keywords:** fulminant colitis, small-cell bladder neoplasia and *C.difficile*.

## Presentación del caso

Se presenta el caso de un varón de 60 años exfumador, sin alergias, natural de Mallorca. Hipertenso, dislipémico, y obeso. A raíz de hematuria e insuficiencia renal aguda, se detecta con cistoscopia una gran masa heterogénea y sangrante en la vejiga, con anatomía patológica de carcinoma de células pequeñas. Precisó colocación de nefrostomías bilaterales por hidronefrosis bilateral.

Se inicia quimioterapia con carboplatino y etopósido. Después de cada ciclo, presenta neutropenia severa febril, que responde bien a los antibióticos. Tras tercer ciclo pancitopenia, fiebre de foco urinario (*E.coli* multisensible) con buena respuesta a tratamiento antibiótico (levofloxacino 500 mg cada día de forma continua). En el TAC de control presenta respuesta parcial. Precisó recolocación de nefrostomía derecha por desplazamiento de catéter.

Cinco meses después de diagnóstico, acude por dolor abdominal y diarrea de tres días de evolución. En exploración física únicamente destaca abdomen globuloso y distendido, depresible, doloroso a la palpación en hipogastrio, semiología de ascitis. En la analítica destaca hemoglobina 9.01 g/dl, leucocitos 830 ul, plaquetas 127000 ul, creatinina 3.35 mg/dl, procalcitonina 21.33 ng/ml, PCR 25.46 mg/dl, lactato 2.66 mmol/l con perfil hepático y bilirrubina normal. Hemocultivos ingreso ne-

gativos. Sedimento de orina con hematuria macroscópica, al microscopio se observan cocos gram positivos. Radiografía de tórax anodina. TAC abdominal destaca engrosamiento de la pared del colon, sigma y recto en relación con colitis y abundante cantidad de líquido libre (Figura 1)

Figura 1: .



Ante la inestabilidad hemodinámica se decide ingreso en unidad de cuidados intensivos. Pese a antibiocioterapia de amplio espectro (meropenem), ventilación mecánica, soporte vasoactivo a dosis elevadas y hemodiafiltración continua, el paciente presenta evolución rápidamente desfavorable con acidosis metabólico-láctica grave, abdomen peritonítico, macrohematuria e inestabilidad hemodinámica refractaria siendo exitus a las 24 horas de ingreso.

## Discusión

En resumen, se trata de un paciente con carcinoma de células pequeñas vesical y neutropenia grado 4 que presenta shock por colitis fulminante. El carcinoma de célula pequeña vesical es un tipo de carcinoma neuroendocrino con una incidencia de <1% de los tumores vesicales. Es muy agresivo y poco diferenciado y generalmente en el momento del diagnóstico se presenta con extensa infiltración de la pared vesical<sup>1</sup>.

Dado que la respuesta a quimioterapia se produce generalmente en el 80% de los tumores de esta estirpe, como en nuestro caso, parece poco probable que el fallecimiento sea por progresión de la enfermedad tumoral.

Existen diferentes patologías que pueden cursar con engrosamiento de la pared del colon por TAC. Se utilizan distintos parámetros para intentar realizar un diagnóstico más preciso sólo basándose en la imagen. Estos parámetros son: a) distribución (observándose en este paciente una distribución pancolónica, sin afectación concomitante del intestino delgado), b) grado de engrosamiento, c) reacción pericolónica y cambios en el mesenterio, d) formación de fístulas/absesos, e) adenopatías (no descritas en este paciente) y f) ascitis (como marcador de lesión aguda).

Teniendo en cuenta las características del TAC y el desenlace fatal de este caso, nos centraremos en aquellas entidades que se desarrollan con un curso fulminante (Tabla I).

Tabla I: Diagnóstico diferencial de la colitis fulminante.

Inflamatoria	Infecciosa	Vascular	Iatrogénica
Colitis ulcerosa	Bacteriana	Isquémica	Rápida
E. Crohn	Virus		Enterocolitis neutropénica
	Parásitos		

En primer lugar la etiología infecciosa. Dentro de las bacterianas, entidades como la *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter* y *Yersinia*, implicadas en la colitis fulminante pero más comúnmente relacionadas con colitis segmentaria. La colitis fulminante por *Clostridium difficile*, anteriormente conocida por CDI grave y complicada<sup>2</sup>, aparece en el 3-8% de las colitis por *Clostridium difficile* y puede caracterizarse por presencia de hipotensión grave que pro-

gresa a fallo multiorgánico, ocasionalmente como íleo con escasa diarrea, o megacolon con dilatación del intestino grueso (>7cm de diámetro en el colon y /o >12 cm en el ciego). El uso de antibióticos<sup>3</sup> es el factor de riesgo más ampliamente reconocido y modificable –fluoroquinolonas las más frecuentemente asociadas (Tabla II)–, y otros factores asociados a colitis severa: neoplasia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, terapia inmunosupresora, insuficiencia renal o exposición a medicamentos antipeptídicos o clindamicina<sup>4</sup>. Dentro de las causas víricas, destacaría la afectación gastrointestinal relacionada con el CMV, dado el grado de inmunosupresión que presenta este paciente. Finalmente, dentro de las parasitarias, cabe mencionar la *Entamoeba histolytica*, desconociéndose en este paciente factores epidemiológicos relacionados y el *Cryptosporidium*, relacionado con estados avanzados de inmunodeficiencia.

Tabla II: Antibióticos relacionados con la colitis por *Clostridium difficile*.

Frecuentemente asociado	Ocasionalmente asociado	Raramente asociado
Fluoroquinolonas	Macrólidos	Aminoglucósidos
Clindamicina	Trimetoprim-sulfametoxazol	Tetraciclinas
Cefalosporinas (amplio espectro)		Metrodinazol
Penicilinas (amplio espectro)		Vancomicina

En segundo lugar las causas inflamatorias, como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn. El diagnóstico de una enfermedad inflamatoria intestinal es muy difícil de realizar clínicamente sobre la base de un único episodio, donde el único criterio clínico sería la presencia de dolor abdominal, dada la inexistencia de síntomas extraintestinales, rectorragias o diarrea crónica<sup>5</sup>.

En tercer lugar, causas vasculares como la colitis isquémica. El colon está predispuesto a la isquemia por su flujo sanguíneo relativamente bajo y su plexo de microvasculatura menos desarrollado en comparación con el intestino delgado<sup>6</sup>. Principalmente se produce por dos mecanismos: a) causas oclusivas, resultado de una oclusión trombotica (arterial o venosa), embolia o traumatismo; y b) causas no oclusivas, siendo el mecanismo más predominante. En el caso descrito, lo más probable es que fuese, en el contexto de shock séptico, por hipoperfusión generalizada que a nivel esplácnico conduce a la llegada de bajo flujo sanguíneo a través de las arterias mesentérica superior e inferior afectando mayoritariamente a zonas de distribución vascular comprometida.

En cuarto lugar, se debe mencionar la posibilidad de una colitis fulminante secundaria a shock séptico de origen diferente al abdominal. Así, podría ser de origen vascular dado que era portador de catéter venoso permanente y/o urinario por varios motivos: cocos gram positivos en orina, infecciones de orina de repetición y repetida manipulación urológica.

Por último, cabe destacar la enterocolitis neutropénica, una patología con elevada mortalidad cuando progresa a necrosis intestinal, perforación, peritonitis y por consiguiente sepsis<sup>7</sup>. La combinación de fiebre, dolor severo en el cuadrante inferior derecho y diarrea asociada a neutropenia es típica de esta enfermedad. Se ve con mayor frecuencia después de la administración de dosis estándar de agentes quimioterapéuticos en pacientes con leucemia, aunque puede ocurrir en pacientes con tumores sólidos, VIH, neutropenia cíclica o trasplantes de órganos. Los criterios diagnósticos incluyen: neutropenia (<1000ul), fiebre y engrosamiento de la pared mural (siendo este último un hallazgo radiológico necesario para su diagnóstico)<sup>8</sup>. Es frecuentemente polimicrobiana con múltiples especies bacterianas implicadas y ocasionalmente hongos.

En conclusión, la concurrencia de antibioterapia prolongada por fluoroquinolonas en paciente con neutropenia por quimioterapia y con alteración de la mucosa del tracto digestivo secundaria, hacen que la etiología más probable de este caso sea la colitis pseudomembranosa por *C. difficile*.

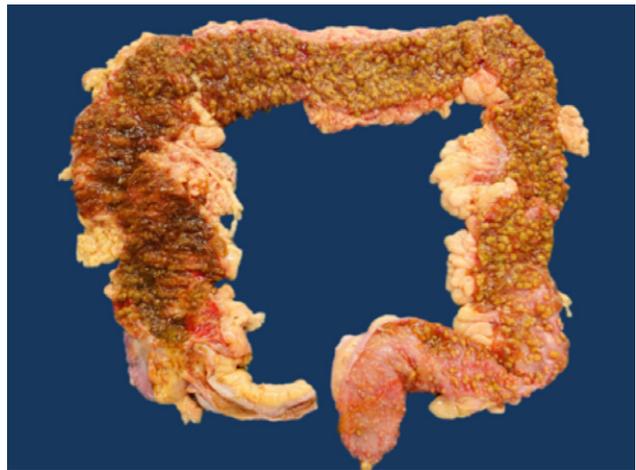
## Examen anatómico y patológico postmortem

En el exámen externo se observa hombre adulto, de raza caucásica que presentaba abdomen globuloso, sin masas ni organomegalias a la palpación.

En el examen interno, pulmones dentro de los límites normales de peso, con congestión basal. Corazón con peso incrementado (490g) y aumento del espesor del ventrículo izquierdo (2,1cm), con presencia de áreas blanquecinas. Arterias coronarias con placas de ateroma sin trombos. En cavidad abdominal, se observó hígado congestivo con peso dentro de la normalidad (1500g). Bazo de aspecto friable. Esófago, estómago e intestino delgado sin particularidades. El colon mostraba desde ciego hasta recto, múltiples lesiones pseudopolipoideas, algunas aisladas y otras confluentes, cubiertas por una capa de aspecto mucoso, de coloración verde-amarillenta (**Figura 2**).

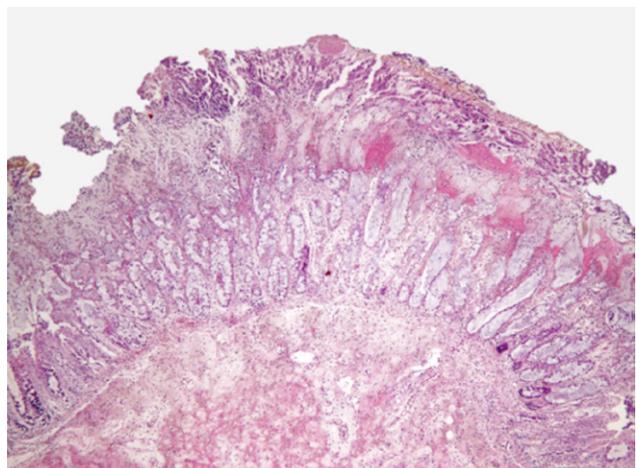
Riñones con peso dentro de la normalidad, con cicatrices corticales irregulares y marcada ureterohidronefrosis. A la apertura de la vejiga se observó gran masa que ocupaba la práctica totalidad de la cavidad y que al corte se observaba blanquecina con focos hemorrágicos, sin claros signos de infiltración del tejido adiposo perivesical. El estudio histopatológico reveló signos de shock como congestión pulmonar, necrosis centrovenosa hepática, congestión esplénica, necrosis tubular aguda y edema de glotis. El miocardio mostró áreas de fibrosis intramiocitaria estrellada, sin observarse inflamación aguda, compatible con áreas de isquemia crónica. La arteria co-

Figura 2: .



ronaria anterior mostró placas de ateroma calcificadas, que ocluían el 50% de la luz. En el colon, las lesiones descritas macroscópicamente corresponden con lesiones polipoides, con necrosis de la mucosa y depósitos en superficie de material fibrinopurulento, con desechos celulares, polimorfonucleares y mucina, así como edema y congestión de la lámina propia y de la submucosa (**Figura 3**). El cultivo microbiológico de biopsias de mucosa colónica resultaron positivos tanto para *Clostridium difficile* como para la toxina A y B. La tumoración vesical corresponde a una neoplasia de crecimiento sólido, constituida por células de pequeño tamaño, con escaso citoplasma y núcleo redondo con presencia de algunos nucléolos, entremezcladas con células de gran tamaño, con citoplasma amplio y eosinófilo y núcleo grande e irregular. El estudio inmunohistoquímico mostró positividad para Citoqueratina 7, p63 y Gata3 en las células de mayor tamaño, mientras que las de menor tamaño fueron positivas para Sinaptofisina y Cromogranina. La médula ósea reveló una disminución de la celularidad hematopoyética para la edad del paciente, a expensas de la serie eritroide y megacariocítica, así como parada de la maduración granulopoyética.

Figura 3: .



Se consideró pues como padecimiento fundamental el carcinoma con diferenciación neuroendocrina con áreas de carcinoma transicional de alto grado (apT3N0M0) en tratamiento quimioterápico y la causa de la muerte shock séptico en el contexto de pancolitis pseudomembranosa por *Clostridium difficile* (bacteria y toxinas positivos en cultivo) en paciente neutropénico.

## Conclusión

La colitis pseudomembranosa es la manifestación de múltiples enfermedades, en este caso el diagnóstico se realizó por la detección de la bacteria y sus toxinas en cultivo. La colitis pseudomembranosa por *Clostridium difficile* es una enfermedad con aumento en su incidencia en los últimos años, cuyos factores de riesgo más

conocidos son<sup>9</sup>: edad avanzada, hospitalización, uso de antibióticos de amplio espectro, inmunosupresión y tratamiento con citotóxicos (como cisplatino y etopósido)<sup>10-11</sup>. La probabilidad de desarrollar pancolitis fulminante, como se menciona en la discusión, se ha visto incrementada en pacientes con enfermedad neoplásica, enfermedad inflamatoria intestinal y en pacientes con cirugía gastrointestinal en los 30 días previos<sup>12</sup>. El *Clostridium difficile* es un bacilo anaerobio, gram-positivo productor de toxinas. Estas toxinas son las que inducen la muerte de los enterocitos, produciendo necrosis de la mucosa. Como respuesta a este daño se produce una respuesta inflamatoria que conlleva la producción de una membrana de fibrina, células inflamatorias, desechos celulares y mucina en la superficie de la mucosa dañada, que se traduce como el hallazgo anatomopatológico de pseudomembranas<sup>13</sup>.

## Bibliografía

1. Fischer-Valuck BW, Rao YJ, Henke LE, Rudra S, Hui C, Baumann BC et al. Treatment Patterns and Survival Outcomes for Patients with Small Cell Carcinoma of the Bladder. *Eur Urol Focus*. 2017
2. Ong GK, Reidy TJ, Huk MD, Lane FR. *Clostridium difficile* colitis: A clinical review. *Am J Surg*. 2017; 213(3):565-71
3. Freifeld AG, Bow EJ, Sepkowitz KA, Boeckh MJ, Ito JI, Mullen CA et al. Clinical practice guideline for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2011 Feb 15; 52(4):e56-93
4. Guh AY, Hocevar Adkins S, Li Q, Bulens SN, Farley MM, Smith Z, et al. Risk Factors for Community-Associated *Clostridium difficile* Infection in Adults: A Case-Control Study. *Open Forum Infect Dis* 2017; 4:ofx171
5. Gomollón F, García-López S, Sicilia B, Gisbert JP, Hinojosa J. Guía clínica GETECCU del tratamiento de la colitis ulcerosa elaborada con la metodología GRADE. *Gastroenterol Hepatol*. 2013; 36(8):e1-e47
6. Kim JS, Kim HJ, Hong SM, Park SH, Lee JS, Kim AY et al. Post-Ischemic Bowel Stricture: CT Features in Eight Cases. *Korean J Radiol*. 2017; 18(6): 936-45
7. Rodrigues FG, Dasilva G, Wexner SD. Neutropenic enterocolitis. *World J Gastroenterol*. 2017; 23(1): 42-7
8. Battle M, Vall-Ilovera F, Bechini J, Camps I, Marcos P. Enterocolitis neutropénica en adultos con leucemia aguda o receptores de un trasplante de progenitores hematopoyéticos: estudio de 7 casos. *Med Clin (Barc)*. 2007; 129(17):660-3
9. Kelly CP, LaMont JT. *Clostridium difficile* – more difficult than ever. *N Engl J Med* (2008) 359:1932-40
10. Areej Khan, Shahzad Raza, Syeda A. Batul, et al. The Evolution of *Clostridium difficile* Infection in Cancer Patients: Epidemiology, Pathophysiology, and Guidelines for Prevention and Management. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*. 2012; 7:157-70
11. Si-lan gu, Yun-Bo Chen, Tao LV, et al. Risk factors, outcomes and epidemiology associated with *Clostridium difficile* infection in patients with haematological malignancies in a tertiary care hospital in China. *J Med Microbiol* 2015 Mar;64(Pt 3):209-16
12. Rolston KV. Infections in Cancer Patients with Solid Tumors: A Review. *Infect Dis Ther*. 2017; 6(1): 69-83.
13. Poutanen SM, Simor AE. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. *CMAJ*. 2004 Jul 6;171(1):51-8



www.ramib.org

---

## Junta Directiva de la Reial Acadèmia de Medicina de les Illes Balears

---

**President** Macià Tomàs Salvà  
**Vicepresident** Fèlix Grases Freixedas  
**Secretari General** Antonio Cañellas Trobat  
**Vicesecretari** Josep F. Forteza Albertí  
**Tresorer** Joan Besalduch Vidal  
**Bibliotecari** Ferran Tolosa Cabani

---

### Acadèmics d'honor

---

2003 - Excm. Sr. Santiago Grisolia García, Premi Príncep d'Astúries  
2007 - Excm. Sr. Ciril Rozman, Premi Jaime I

---

### Acadèmics numeraris

---

M.I. Sra. Juana M. Román Piñana  
M.I. Sr. José Tomás Monserrat  
M.I. Sr. Bartolomé Anguera Sansó  
M.I. Sr. Bartolomé Nadal Moncadas  
M.I. Sr. Alfonso Ballesteros Fernández  
M.I. Sr. Francesc Bujosa Homar  
M.I. Sr. Ferran Tolosa Cabaní  
Excm. Sr. Macià Tomàs Salvà  
M.I. Sra. Juana M. Sureda Trujillo  
M.I. Sr. Juan Buades Reinés  
M.I. Sr. José L. Olea Vallejo  
M.I. Sr. Pere Riutord Sbert  
M.I. Sr. Joan Besalduch Vidal  
M.I. Sr. Fèlix Grases Freixedas  
M.I. Sr. Antonio Cañellas Trobat  
M.I. Sr. Josep F. Forteza Albertí  
M.I. Sr. Jordi Ibáñez Juvé  
M.I. Sr. Joan March Noguera  
M.I. Sr. A. Arturo López González  
M. I. Sra. Pilar Roca Salom  
M. I. Sr. Javier Cortés Bordoy  
M.I. Sr. Lluís Masmiquel Comas

---

### Acadèmics supernumeraris

---

M.I. Sr. Alvaro Agustí García-Navarro  
M.I. Sra. Marta Couce Matovelle

---

### Acadèmics emèrits

---

M.I. Sr. Miguel Munar Qués  
M.I. Sr. Arnaldo Casellas Bernat



[www.ramib.org](http://www.ramib.org)

---

### **Protectors de la Reial Acadèmia**

Banca March  
Conselleria de Presidència  
ASISA  
Conselleria de Salut  
Col·legi Oficial de Metges de les Illes Balears  
Fundació Patronat Científic del Col·legi de Metges

---

### **Benefactors de la Reial Acadèmia**

Salut i Força

---

### **Patrocinadors de la Reial Acadèmia**

Clínica Rotger  
Metges Rosselló  
Grup Hospitalari Quirónsalud  
Societat Balear de Medicina Intensiva i Unitats Coronàries  
Col·legi Oficial d'Infermeria de les Illes Balears  
Associació Espanyola contra el Càncer a les Illes Balears

# MEDICINA · BALEAR

PUBLICACIÓ DE LA REIAL ACADEMIA DE MEDICINA DE LES ILLES BALEARS

[www.medicinabaleaer.org](http://www.medicinabaleaer.org)